

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Maria Graziela Zagatto Krug Baldacin

“Caracterização do gene *Zmlim-1* de milho e seu papel na tolerância ao alumínio”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Maria Graziela Zagatto Krug Baldacin
[Assinatura]
é aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Genética e Biologia Molecular, na área de
Genética Vegetal e Melhoramento

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Menossi

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA –
UNICAMP**

B19c

Baldacin, Maria Graziela Zagatto Krug
Caracterização do gene *Zmlim-1* de milho e seu papel na
tolerância ao alumínio / Maria Graziela Zagatto Krug
Baldacin. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Marcelo Menossi Teixeira.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Quinases Lim – Genética. 2. Plantas – Efeito do
alumínio. 3. Biocompatibilidade. 4. Superexpressão. I.
Teixeira, Marcelo Menossi. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Characterization of a maize gene *Zmlim-1* and its role in aluminum tolerance.

Palavras-chave em inglês: Lim quinases - Genetics; Effect of aluminum in
plants; Biocompatibility; Overexpression.

Área de concentração: Genética Vegetal e Melhoramento.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Marcelo Menossi Teixeira, Andréa Almeida Carneiro, Carlos Augusto
Colombo, Márcio José da Silva, Ricardo Augusto Dante.

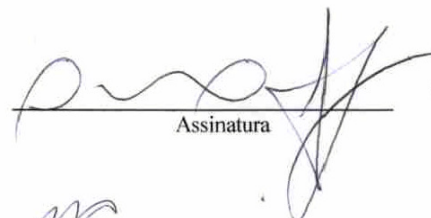
Data da defesa: 12/07/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 12 de julho de 2010

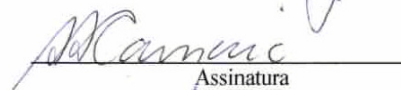
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr . Marcelo Menossi (Orientador)



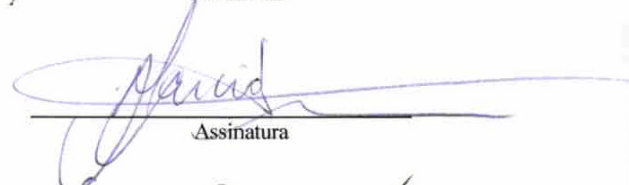
Assinatura

Profa. Dra. Andrea Almeida Carneiro



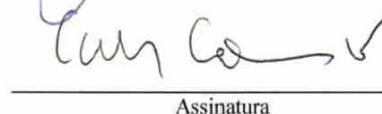
Assinatura

Prof. Dr Márcio José da Silva



Assinatura

Prof. Dr. Carlos Augusto Colombo



Assinatura

Prof. Dr Ricardo A. Dante



Assinatura

Prof(a). Dr(a) Raquel Luciana Boscariol Camargo

Assinatura

Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira

Assinatura

Prof. Dr Jurandir Vieira de Magalhães

Assinatura

AGRADECIMENTOS

À Deus, o autor da vida, por poder celebrar constantemente o amor, os amigos, o conhecimento e a ciência;

Ao Prof. Dr. Marcelo Menossi, pela paciência e orientação concedida durante a realização do presente trabalho;

Ao Prof. Dr. Renato A. Jorge (Departamento de Química-Unicamp) pelo espaço sempre concedido em seu laboratório, pelo auxílio durante as análises de estresse por Al;

À Dra. Andréa Almeida Carneiro (EMBRAPA Milho e sorgo) pelo auxílio durante as transformações de milho, por termos conseguido perpetuar o transgene, graças ao cruzamento realizado em Sete Lagoas, por todo o carinho e auxílio durante minha estadia lá;

À Profa. Dra Sandra Carmelo (Depto Botânica/Unicamp) pelo acompanhamento durante os cortes histológicos;

Ao Prof. Dr. Gilberto Batista de Souza (EMBRAPA /São Carlos) pelo auxílio durante as análises de quantificação de lignina nas plantas transgênicas;

À Dra. Adriana Capella por ter me dado força e apoio durante estes anos na Alellyx e finalizando o Doutorado,

Ao CNPq pela bolsa concedida;

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Campinas pela oportunidade;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genoma Funcional: Camila, César, Diego, Éder, Eduardo, Kevin, Juliana, Fábio, Lúcia, Renata, Sandra, Rafael, Raphael, Thiago, Vanúsia pelos bons momentos compartilhados, apoio e amizade;

Aos grandes amigos Agustina Gentile, Eduardo Mariano, Sandra Camargo, Vanúcia Amorim presentes em todos os momentos, nas técnicas realizadas, conversas, almoços, conselhos, pelos bons momentos compartilhados, pelo apoio e incentivo;

Aos funcionários da Unicamp, em especial às funcionárias da Seção de Pós Graduação e à Lourdes pela eficiência, colaboração e auxílio nos momentos finais da Tese;

À Agustina Gentile, minha amiga, que não mediu esforços para me ajudar nas correções do artigo e da tese, por todo apoio e dedicação nestes últimos meses;

Aos amigos da Alellyx que muito me apoiaram: Solange Silva (Sol), Ana Paula Rizzato, Sandra Camargo, Sílvia Filippi pelo auxílio nos momentos finais da tese, com a qRT-PCR, os ensaios de lignina e discussão dos dados, pelo apoio, motivação e incentivo;

Ao meu querido marido, Carlos Eduardo Baldacin, meu suporte e amparo em todo o tempo, muito obrigada por toda a compreensão, por seu cuidado, paciência e carinho, pela super ajuda no final desta etapa, pelos longos dias de estudo me suportando em amor;

Aos meus pais: Francisco José Krug e Maria Lucia, sem vocês eu não chegaria até aqui! Ao meu Paizão, a minha eterna gratidão pelas discussões científicas, pelas críticas, pelas horas que passamos revendo a revisão bibliográfica, pelo apoio constante em todos os momentos da minha vida.

Ao Mateus (ainda dentro da barriga), que está agüentando firme, a maratona de trabalhar e estudar, me dando ainda mais alegria e força para continuar.

ÍNDICE

Lista de Figuras e Tabelas.....	viii
Resumo	x
Abstract.....	xi
 1 Introdução	1
1.1 Solos ácidos e toxidez do Al.....	1
1.2 Mecanismos de tolerância e toxidez do Alumínio	2
1.2.1 Efeitos tóxicos do Alumínio	2
1.2.2 Mecanismos de tolerância e resistência ao Alumínio	5
1.3 Expressão de genes em plantas transgênicas visando a tolerância ao Alumínio	7
1.4 Proteínas de plantas contendo o domínio LIM.	9
1.5 Justificativa	13
1.6 Objetivos.....	15
 2 Materiais e Métodos.....	16
2.1 Material Vegetal.....	16
2.2 Avaliação da expressão do gene <i>Zmlim-1</i> frente à indução por alumínio	16
2.3 Ensaio de expressão via <i>northern blot</i>	17
2.3.1 Extração de RNA	17
2.3.2 Hibridização	18
2.4 Hibridação <i>in situ</i>	18
2.5 Construção dos cassetes de expressão	19
2.5.1 Síntese de cDNA.....	19
2.5.2 PCR a partir do cDNA	20
2.5.3 Construção gênica para superexpressão do gene <i>Zmlim-1</i>	21
2.6 Determinação da localização subcelular da proteína <i>Zmlim-1</i>	22
2.6.1 Amplificação e clonagens do gene <i>Zmlim-1</i> visando fusão com o gene <i>gfp</i>	22
2.6.2 Transformação de epitélio de cebola	24
2.6.3 Visualização da localização subcelular das proteína ZMLIM-1.....	24
2.7 Determinação das interações da proteína utilizando o sistema de duplo híbrido em leveduras	24
2.7.1 Clonagem do gene <i>Zmlim-1</i> em pGBKT7	26
2.7.2 Verificação da ativação dos genes repórteres e da toxicidade em levedura	26
2.7.3 Construção da biblioteca de cDNA de plantas de milho submetidas à estresse por alumínio	27

2.7.4	Análise da interação por <i>mating type</i>	27
2.7.5	Identificação de clones positivos	28
2.8	Transformação genética de milho superexpressando o gene <i>Zmlim-1</i>	28
2.8.1	Produção de calos embriogênicos	28
2.8.2	Transformação genética de calos via biobalística.....	29
2.9	Extração e análise do DNA genômico	30
2.9.1	<i>Southern blot</i>	30
2.9.2	Preparação da sonda para o <i>Southern blot</i>	31
2.10	Ensaio de tolerância ao Al.....	31
2.10.1	Avaliação do crescimento radicular das plantas de milho em meio líquido	31
2.11	Avaliação de expressão do gene <i>Zmlim-1</i> por qRT-PCR	32
2.11.1	Síntese de cDNA.....	32
2.11.2	Eletroforese em gel de Agarose	32
2.11.3	PCR em tempo real	33
2.12	Avaliação do teor de lignina nas linhagens transgênicas.....	33
2.12.1	Avaliação anatômica via coloração por fluoroglucinol	33
2.12.2	Quantificação de lignina	34
3	Resultados.....	35
3.1	Clonagem do gene <i>Zmlim-1</i>	35
3.2	Caracterização do gene <i>Zmlim-1</i> em resposta ao estresse por alumínio.....	39
3.3	Localização dos transcritos de <i>Zmlim-1</i>	40
3.4	Determinação da localização subcelular da proteína ZMLIM-1	42
3.5	Interação de <i>Zmlim-1</i> com outras proteínas.....	44
3.6	Transformação genética de calos de milho com o gene <i>Zmlim-1</i>	46
3.6.1	Obtenção e seleção das plantas transformadas	46
3.6.2	Caracterização das plantas transgênicas por <i>Southern blot</i>	51
3.6.3	Avaliação fenotípica de plantas que superexpressam o gene <i>Zmlim-1</i>	54
3.6.4	Avaliação do padrão de expressão do transcrito de <i>Zmlim-1</i>	56
3.6.5	Avaliação do conteúdo de lignina nas plantas transgênicas	57
4	Discussão.....	59
4.1	Identificação e isolamento do gene <i>Zmlim-1</i> de milho	59
4.2	Caracterização molecular do gene <i>Zmlim-1</i>	61
4.3	Caracterização das proteínas que interagem com ZMLIM-1	63
5	Conclusões	66
6	Referências.....	67
7	Anexo.....	74

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Representação esquemática do vetor pUBILN	21
Figura 2. Representação esquemática do plasmídeo pAHC20	22
Figura 3. Construção p2GWF7 utilizada na expressão transiente..	23
Figura 4. Mapa que mostra os dois plasmídeos utilizados no ensaio de duplo híbrido.....	26
Figura 5. Identificação de um gene de milho através da técnica <i>mRNA Differential Display</i>	36
Figura 6. Sequência completa do cDNA e a proteína deduzida obtida por <i>mRNA Differential Display</i> e 5' RACE-PCR.....	37
Figura 7. Representação esquemática de proteínas contendo domínio LIM em plantas.	37
Figura 8. Alinhamento da proteína ZMLIM-1 com outras proteínas homólogas.....	38
Figuras 9 e 10 . Expressão e quantificação do gene <i>Zmlim-1</i> em ápices radiculares de plântulas expostas ao Al durante 24 horas.....	40
Figura 11. Localização <i>in situ</i> de mRNA do gene <i>Zmlim-1</i> em ápices de raiz de milho.....	41
Figura 12. Localização subcelular da proteína ZMLIM-1.....	43
Figura 13. Ensaio de duplo-híbrido em levedura.....	44
Figura 14. Transformação genética de milho a partir de calos embriogênicos com a construção pUBILIM em cotransformação com o vetor pAHC20.....	47
Figura 15. Efeito da aplicação de ppt em folhas de plantas de milho.....	48
Figura 16. Representação esquemática do cassete de expressão pUBI::Zmlim1::NOS.....	49
Figura 17. Resultados da análise de PCR com plantas transgênicas e selvagem com os primers 5'Ubi_Intron e Zmlim1_STOP.....	49
Figura 18. Representação esquemática dos cassetes de expressão pUBI::ZMLIM1::NOS e pAHC20.....	50
Figura 19. Análise da integração dos dois transgenes.	50
Figura 20. <i>Southern blot</i> do DNA genômico das plantas transgênicas geração T0.....	52
Figura 21. Sequência da transformação genética de milho via biobalística.	53
Figura 22. Efeito do alumínio em diferentes linhagens de milho.	55
Figura 23. Expressão relativa do transcrito do gene <i>Zmlim-1</i> em plantas transgênicas de milho	56
Figura 24. Coloração de tecidos de milho através do fluoroglucinol.	57

oTabela 1. Exemplos de plantas transgênicas de diferentes espécies visando aumentar a tolerância ao alumínio.....	8
Tabela 2. Ensaio de duplo híbrido em leveduras.	46
Tabela 3. Quantificação de lignina em planta selvagem e transgênicas superexpressando <i>Zmlim-1</i> . A análise foi feita com duas repetições.....	57

RESUMO

A toxidez por alumínio (Al^{3+}) é o principal fator limitante da produção agrícola em grandes áreas do Brasil e do mundo. Sabe-se que a defesa das plantas a este elemento é controlada por múltiplos genes. A caracterização de genes cuja expressão é induzida pelo Al contribui para compreender as defesas ativadas pelas plantas. Neste trabalho identificou-se um cDNA de milho expresso em raízes através da técnica de *mRNA differential display*. Este cDNA codifica uma sequência que contém dois domínios LIM, separados por um espaçador de 40-50 resíduos, sendo denominado *Zmlim-1*. O objetivo deste trabalho é a caracterização deste gene e o seu papel na tolerância ao Al em milho. Em estudos de expressão verificou-se que o gene *Zmlim-1* é induzido por Al e sua expressão é maior na linhagem tolerante, Cat100-6, quando comparado com a linhagem sensível S1587-17. O direcionamento da proteína ZMLIM-1 foi observado em epitélios de cebola bombardeados com a construção fusionada à proteína GFP (*green fluorescent protein*). A expressão transiente revelou que esta proteína está localizada no citoplasma e no núcleo. A hibridização *in situ* demonstrou que *Zmlim-1* é expresso na maioria das células do ápice de raiz de milho. O sistema de duplo híbrido de levedura permitiu identificar três proteínas que interagem com a proteína ZMLIM-1: duas proteínas da subunidade ribossomal e uma proteína da família OMT envolvida na biossíntese de lignina. Plantas transgênicas silenciando este gene forneceram evidências de que o gene *Zmlim-1* pode influenciar a anatomia da raiz e a quantidade de lignina. Este é o primeiro relato de interação OMT com proteínas de domínio LIM, sugerindo um envolvimento desta proteína com a biossíntese de lignina. Plantas transgênicas submetidas ao estresse por Al^{3+} não apresentaram diferenças com relação às plantas controle não transformadas.

ABSTRACT

Aluminum (Al) toxicity is the main factor limiting agricultural production in large areas in Brazil and in the world. It is known that plant defenses against this element are controlled by multiple genes. The characterization of genes whose expression is induced by Al contributes to the understanding of the defenses activated by plants. In this work we identified a cDNA expressed in maize roots using *mRNA differential display*. This cDNA encodes a sequence that contains two LIM domains separated by a spacer of 40-50 residues, being named *Zmlim-1*. The purpose of this study was the characterization of this gene and its involvement in Al tolerance in maize. In expression studies it was found that the *Zmlim-1* gene was induced by Al and its expression was higher in the tolerant line, Cat100-6 when compared with the sensitive line S1587-17. The subcellular localization of the protein ZMLIM-1 was observed in onion epithelial cells bombarded with a ZMLIM-1::GFP (green fluorescent protein) fusion. The assay of transient expression revealed that this protein is localized in cytoplasm and nucleus. *In situ hybridization* showed that *Zmlim-1* is expressed in most cells of the root apex of maize. The yeast two hybrid system identified three proteins that interact with ZMLIM-1 protein: two-ribosomal subunit proteins and a protein from the OMT family involved in lignin biosynthesis. Transgenic plants silenced for this gene have provided evidence that *Zmlim-1* gene can influence the anatomy of the root and the amount of lignin in the plants. This is the first report of OMT interaction with LIM domain proteins, suggesting an involvement of this protein with lignin biosynthesis. Transgenic plants subjected to Al³⁺ stress did not show differences when compared to control, untransformed plants.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Solos ácidos e toxidez do Al

Os solos ácidos correspondem a cerca de 30% das terras cultiváveis no mundo e apresentam sérias limitações à produtividade agrícola (Kochian et al., 1995). A acidificação do solo tem se tornado um problema sério em países desenvolvidos devido à chuva ácida, à remoção da cobertura natural da área de produção e principalmente à utilização de fertilizantes nitrogenados amoniacais (Johnson et al., 1997).

Segundo o Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo da EMBRAPA (http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/fertilidade.htm), os solos brasileiros, são predominantemente ácidos, principalmente aqueles sob vegetação de cerrado. Tais solos são caracterizados por baixas concentrações de cálcio e de magnésio, elementos diretamente envolvidos no desenvolvimento das raízes, por valores elevados de alumínio trocável e pela baixa disponibilidade de fósforo.

Nestes solos, o alumínio (Al) fitotóxico é o principal estresse abiótico limitante da produtividade agrícola. O Al é considerado o elemento mais abundante na constituição do solo, e o terceiro elemento mais encontrado na crosta terrestre. Em solos com pH relativamente baixo ($\text{pH} < 5$), o Al é solubilizado, predominando a forma Al^{3+} que é tóxica às plantas e pode interferir severamente no desenvolvimento vegetal. Desta forma, os estudos sobre resistência ao estresse causado pelo Al^{3+} têm grande relevância do ponto de vista econômico.

Entre as culturas mais afetadas pelos solos ácidos encontra-se o milho, destacando-se por perdas significativas em sua produtividade devido ao estresse causado pelo Al^{3+} . De acordo com os dados do Centro de Inteligência do Milho, o Brasil é o terceiro maior produtor de milho do mundo, com cerca de 60 milhões de toneladas em 2008, atrás da China (166 milhões), e dos Estados Unidos (307 milhões)

(<http://cimilho.cnpms.embrapa.br/estatisticas/estatisticas.php?tabela=004> acessado em 31/05/2010).

O sintoma mais evidente da toxidez do Al é a inibição do crescimento radicular, tendo em vista que o sítio primário de ação fitotóxica deste íon localiza-se na parte distal da zona de transição do ápice das raízes (Ryan et al., 1993; Sivaguru e Horst, 1998). A absorção e o acúmulo do Al em diferentes partes da planta afetam células e suas organelas em níveis morfológico, citogenético e fisiológico, prejudicando o desenvolvimento da planta, principalmente do sistema radicular (Kumar et al., 1995; Wagatsuma et al., 1995) provocando injúrias e retardamento do crescimento (Machado e Pereira, 1990).

As estratégias utilizadas para amenizar os problemas causados pelo excesso de Al no solo incluem o uso da calagem, para neutralizar a acidez nas camadas superficiais do solo, e o uso de plantas resistentes e/ou tolerantes. Entretanto, a aplicação de CaCO_3 apresenta pouca mobilidade para penetrar no subsolo e corrigir a acidez do solo. Além disso, em muitos casos, o custo deste insumo e o seu transporte são fatores limitantes.

Neste contexto, o uso de plantas resistentes ou tolerantes é uma solução mais prática e econômica. A identificação e a caracterização de genes envolvidos na tolerância ao Al contribui para o entendimento dos mecanismos de toxicidade e de tolerância, bem como abre perspectivas para a produção de plantas mais adaptadas aos solos ácidos.

1.2 Mecanismos de tolerância e toxidez do Alumínio

1.2.1 Efeitos tóxicos do Alumínio

A toxidez causada pelo Al em plantas inibe o crescimento de raízes e modifica sua arquitetura levando a uma exploração pouco efetiva de nutrientes, água e suporte dados pelo solo (Kochian, 1995). Quando atinge concentrações micromolares, o Al^{3+} pode inibir o crescimento das raízes em poucos minutos ou horas, acarretando prejuízos significativos.

O ápice radicular e a zona distal de transição de raízes foram identificados como as principais regiões de ação fitotóxica do alumínio em plantas (Ryan et al., 1993; Sivaguru e Horst, 1998).

Estudos detalhados na distribuição espacial dos efeitos da toxidez do Al^{3+} no ápice radicular de plantas de milho revelaram que a zona de transição é a parte mais sensível ao alumínio (Sivaguru e Horst, 1998). De acordo com Poschenrieder et al., (2008) esta zona é localizada entre a zona de divisão celular ativa e a zona de rápida elongação celular. A maneira como esta zona específica reconhece o status nutricional do solo e como esta informação é transduzida guiando a respostas adaptativas do crescimento da raiz têm sido foco de muita atenção destacando-se interações com constituintes da parede celular, com a membrana plasmática ou com regiões do simplasto.

Existem diversas hipóteses relacionadas aos mecanismos de toxidez do Al (Kochian, 1995; Richards et al., 1998; Barceló e Poschenrieder, 2002) os quais estão relacionados principalmente com os componentes celulares afetados das raízes. A parede celular e espaços intercelulares, que correspondem ao apoplasto são os primeiros compartimentos da raiz que entram em contato com o Al^{3+} tóxico presente na solução do solo. Muitos estudos têm mostrado que a maioria do Al acumulado na raiz localiza-se no espaço apoplástico (Heim et al., 1999).

Segundo Ma (2007) as proporções de Al aderido à parede celular, relativo à quantidade total de Al presente na raiz, variam de 85 a 99,9%. Isto significa que apenas uma pequena quantidade de Al atravessa a membrana plasmática das células radiculares, ou seja, apenas uma pequena fração do Al total corresponde ao Al simplástico.

Cabe observar que o enrijecimento da parede celular tem sido observado em diferentes experimentos em resposta ao estresse do Al (Gunsé et al., 1997; Ma et al., 2004).

Além disso, existem diversos estudos que apontam para a inibição do crescimento radicular causada pelo Al como um resultado de uma redução na taxa de divisão celular (Kochian, 1995). Assim, observou-se que o crescimento radicular pode ser inibido pelo Al^{3+} em

1-2 horas de exposição. No entanto, a divisão celular é um processo relativamente lento e a alongação celular é o fator que mais contribui para o crescimento total da raiz. Num período entre 1 e 2 horas, a divisão celular pode contribuir com apenas 1-2% da alongação radicular total (Sharp et al., 1988). Portanto, é provável que os estágios iniciais de inibição do crescimento radicular estejam ligados a interações do Al com a alongação celular. Por outro lado, a inibição da divisão celular pelo Al pode contribuir na inibição do crescimento radicular detectada após as primeiras 24 horas de exposição.

A ligação do Al à membrana plasmática está associada a mudanças em sua composição química como a fluidez e a separação da fase lipídica desta membrana, levando a mudanças no potencial e na atividade dos canais de íons, a alteração do equilíbrio de Ca^{2+} (Rengel e Zhang, 2003), a inibição dos cátions de adenosina trifosfato (H^+ -ATPase) (Ahn et al., 2001) e a peroxidação de lipídeos (Corrales et al., 2008).

O estresse oxidativo tem sido considerado um importante efeito tóxico do Al, devido ao aumento da atividade das enzimas superóxido dismutase e peroxidase, envolvidas na detoxificação de espécies reativas de oxigênio, em soja (Cakmak & Horst, 1991), ervilha (Yamamoto et al., 2001) e tabaco (Ono et al., 1995; Yamamoto et al., 1997; Ikegaw et al., 2000). O estresse oxidativo causa a peroxidação de lipídeos em ervilha e tabaco (Ono et al., 1995; Yamamoto et al., 1997), mas não em milho, conforme resultados apresentados por Boscolo et al. (2003). Curiosamente, observou-se que em milho ocorre oxidação de proteínas, algo até então desconhecido em plantas (Boscolo et al., 2003). Nesse trabalho também constatou-se que a oxidação de proteínas ocorre após a inibição do crescimento radicular pelo Al, indicando que existem outros alvos da toxidez desse íon.

Em resumo, os componentes celulares afetados pelo alumínio incluem suas interações com a parede celular das raízes e com os constituintes simplásticos (Lazof et al., 1994; Poschereinder et al., 2008), a redução na taxa de divisão celular (Sharp et al., 1988; Kochian,

1995), diminuição da elasticidade da parede celular (Gunsé et al., 1997; Ma et al., 2004), alterações na fluidez e no potencial da membrana plasmática (Horst et al. 1999; Kinraide et al., 2001), o estresse oxidativo (Ono et al., 1995; Yamamoto et al., 1997; Yamamoto et al., 2001, Boscolo et al., 2003), inibição da via da fosfolipase C (Ramos-Diaz et al., 2007), inibição do tráfego de vesículas (Illés et al., 2006), dinâmicas do citoesqueleto (Sivaguru et al., 1999), inibição do transporte de auxina (Kollmeier et al., 2000) e interações com outros fitohormônios (Gunsé et al., 2002).

1.2.2 Mecanismos de tolerância e resistência ao Alumínio

Diversas estratégias utilizadas pelas plantas para a resistência ao Al^{3+} têm sido propostas, como a exsudação de ácidos orgânicos (Delhaize et al., 1993; Pellet et al., 1996) e compostos fenólicos (Kidd et al., 2001) pelas raízes, e a alcalinização da rizosfera (Taylor, 1991). Com base na fisiologia da resistência ao Al^{3+} , dois mecanismos foram propostos: mecanismo interno de tolerância, que permite à planta tolerar o acúmulo do Al no simplasto, e mecanismos baseados na exclusão de Al do ápice radicular (Kochian, 1995).

Os mecanismos internos (tolerância) estão relacionados com a detoxificação do Al no simplasto (Wenzl et al., 2001), ou seja o Al entraria no simplasto e a tolerância seria alcançada através de sua imobilização, compartimentalização ou detoxificação (Taylor, 1991; Kochian, 1995). Como exemplo de mecanismos, pode-se citar a quelação do Al no citosol, a compartimentalização no vacúolo e a expressão de proteínas ligantes de Al (Taylor, 1988; Kochian, 1995; Delhaize e Ryan, 1995). Já os mecanismos externos de exclusão impediriam a entrada do Al na célula, desta forma, protegendo os sítios intracelulares sensíveis ao ataque do íon. Estes mecanismos incluem: exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes, imobilização do Al na parede celular, permeabilidade seletiva da membrana plasmática, formação de uma barreira de

pH na rizosfera induzida pela planta, exsudação de agentes quelantes e o efluxo de Al (Taylor, 1988; Kochian et al., 2004).

A exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes é o mecanismo mais aceito. Os ácidos orgânicos freqüentemente liberados pelo ápice são o cítrico em milho (Pellet et al., 1995), aveia e rabanete (Zheng et al., 1998a), em soja (Yang et al., 2001) e tabaco (Delhaize et al., 2001), oxálico em *Fagopyru esculentum* (Ma et al., 1997) e málico em genótipos tolerantes de trigo (Delhaize et al., 1993). Os ânions destes ácidos orgânicos podem formar complexos suficientemente fortes com o Al^{3+} , protegendo, assim, as raízes das plantas.

No entanto, Piñeros e Kochian, (2001) observaram que alguns genótipos de milho são tolerantes ao Al independentemente da liberação de ácidos orgânicos. Além disso, Piñeros et al., (2005) verificaram que a resistência ao Al não está associada apenas à liberação de citrato das raízes de seis genótipos de milho, sendo este um processo complexo que pode envolver vários mecanismos como a elevação do pH da rizosfera, mudanças na concentração interna de citrato, translocação de Al para as gemas e a exsudação de quelantes ao Al no citosol. Jorge e Menossi (2005) verificaram a correlação entre a liberação de anions orgânicos e o conteúdo de Al em duas linhagens de milho, Cat 100-6 (tolerante) e S1587-17 (sensível) tratadas com antagonista do canal aniônico e La^{3+} , um canal de cátion bloqueador. Em seu estudo, observaram que a linhagem Cat100-6 acumulou menos Al enquanto a liberação de citrato foi semelhante nas duas linhagens, indicando que existem outros mecanismos para a resistência ao alumínio, provavelmente associado ao número/atividade dos canais aniônicos durante a exsudação de citrato pelas raízes das duas linhagens. Em estudos recentes Silva et al., (2001) não encontraram uma correlação positiva significativa entre a exsudação de citrato e a tolerância a Al analisando 4 genótipos de soja. Esses resultados foram semelhantes aos apresentados por Nian et al. (2004), que também avaliaram genótipos de soja, sugerindo que a exsudação de citrato não deve ser o

principal mecanismo de tolerância ao Al^{3+} . Esses dados reforçam a hipótese da existência de vários mecanismos atuando na tolerância ao estresse por Al^{3+} .

1.3 Expressão de genes em plantas transgênicas visando a tolerância ao Alumínio

A identificação de genes cuja expressão é induzida pelo Al ou que atuem em rotas metabólicas relacionadas com a tolerância (como o caso dos ácidos orgânicos) é fundamental para a manipulação genética, visando à obtenção de plantas com maior tolerância ao Al. Os relatos da obtenção de plantas transgênicas associados à ampla diversidade de funções dos genes induzidos por Al e aos sintomas de toxidez reforçam a noção de que os mecanismos de defesa da planta são controlados por múltiplos genes. De fato, Sibov et al.(1999), identificaram a presença de dois locos cromossômicos em milho, relacionados à tolerância ao Al, um localizado no braço curto do cromossomo 6 e outro localizado no cromossomo 10. Em outro estudo de mapeamento em milho, 5 regiões distintas foram identificadas como importantes para a resistência ao Al (Ninamango et al., 2003), corroborando a existência de múltiplos mecanismos para a resistência.

Através de técnicas da engenharia genética é possível aumentar a tolerância ao alumínio em espécies sensíveis através da superexpressão de genes endógenos ou da expressão de genes de outras espécies. Diversos exemplos têm sido relatados com plantas de tabaco e mamão (Fuente et al., 1997), canola (Anoop et al., 2003), arabidopsis (Koyama et al., 2000) e alfafa (Tesfaye et al., 2001). Estas plantas apresentaram tolerância ao Al^{3+} , devido ao aumento da biossíntese de ácidos orgânicos através da superexpressão do gene da citrato sintetase (CS), ou do gene da malato desidrogenase derivados de plantas ou bactérias. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos (adaptada de Mariano et al. 2005).

Tabela 1. Exemplos de plantas transgênicas de diferentes espécies visando aumentar a tolerância ao alumínio

Gene	Origem	Recipiente	Resultado	Referência
<i>CSb (citrato sintase)</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Tabaco, mamã</i>	+	1
<i>DcCS (citrato sintase)</i>	<i>Cenoura</i>	<i>A. thaliana</i>	+	2
<i>CSb (citrato sintase)</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Tobacco, alfafa</i>	=	3
<i>neMDH (malato desidrogenase)</i>	<i>Alfafa</i>	<i>Alfafa</i>	+	4
<i>PEPC (fosfoenolpiruvato carboxilase)</i>	<i>Alfafa</i>	<i>Alfafa</i>	=	4
<i>cit1 (citrato sintase)</i>	<i>Tabaco</i>	<i>Tabaco</i>	=	5
<i>At-miCS (citrato sintase)</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>Oilseed rape</i>	=	6
<i>ALMT1 (canal de malato)</i>	<i>Trigo</i>	<i>Arroz</i>	=	7
<i>ALMT1 (canal de malato)</i>	<i>Trigo</i>	<i>Cevada</i>	+	8
<i>AtBCP (Blue copper binding protein)</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	+	9
<i>AtBPI (inibidor de protease)</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	=	9
<i>AtPOX (peroxidase)</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	=	9
<i>HSP150 (heat shock protein)</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. thaliana</i>	=	9
<i>NtGDI (inibidor de dissociação de GDP)</i>	<i>Tabaco</i>	<i>A. thaliana</i>	+	9
<i>NtPOX (peroxidase)</i>	<i>Tabaco</i>	<i>A. thaliana</i>	+	9
<i>parA (função desconhecida)</i>	<i>Tabaco</i>	<i>A. thaliana</i>	=	9
<i>parB (glutathione S-transferase)</i>	<i>Tabaco</i>	<i>A. thaliana</i>	+	9
<i>Wali5 (Bowman-Birk protease inhibitor)</i>	<i>Trigo</i>	<i>A. thaliana</i>	=	9
<i>WMnSOD (mitochondrial manganese superóxido dismutase)</i>	<i>Trigo</i>	<i>Oilseed rape</i>	+	10
<i>Wak1 (receptor kinase associado parede celular)</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>A. thaliana</i>	+	11
<i>IMPDH (iosina-5'-monofosfato desidrogenase)</i>	<i>Soja</i>	<i>A. thaliana</i>	+	12

(1) de la Fuente et al. (1997); (2) Koyama et al. (2000); (3) Delhaize et al. (2001); (4) Tesfaye et al. (2001); (5) Delhaize et al. (2003); (6) Anoop et al. (2003); (7) Sasaki et al. (2004); (8) Delhaize et al. (2004); (9) Esaki et al. (2000); (10) Basu et al. (2001); (11) Sivaguru et al. (2003); (12) Ermolayev et al. (2003).

+: aumento da tolerância ao Al^{3+}

=: nenhuma diferença relativa a tolerância ao Al^{3+}

Delhaize et al. (2004), obtiveram plantas de cevada (*Hordeum vulgare*) tolerantes ao Al^{3+} através da superexpressão do gene *ALMT1* isolado de trigo (*Triticum aestivum*) que codifica um transportador de malato, demonstrando que a expressão deste gene confere um efluxo de malato

que ativa o mecanismo de tolerância ao Al^{3+} . Após exposição a doses tóxicas de Al verificou-se que as plantas apresentaram tolerância a este metal em cultivos hidropônicos e em solos ácidos.

Por outro lado Ezaki et al., 2001, empregando plantas transgênicas de *Arabidopsis*, avaliaram com sucesso o papel de genes não relacionados com a liberação de ácidos orgânicos de tabaco (*NtGDI1*, *parB*, *NtPox*,) e de arabidopsis (*AtBCB*). Estes genes estão relacionados a diferentes funções bioquímicas. O gene *NtGDI1*, reconhecido como inibidor de dissociação de GDP está envolvido com o transporte de vesícula, o gene *AtBCB* codifica uma proteína ligante de cobre sendo caracterizado por estar associado a vários aspectos do metabolismo, como lignificação da parede celular (Drew e Gatehouse, 1994), catálise de elétrons durante a fotossíntese (Van Gysel et al., 1993) tendo sido induzido por Al (Richards et al., 1998) e por estresse oxidativo (Richards et al., 1998; Miller et al., 1999). O gene *parB* codifica a enzima GST (glutathione-S-transferase) e o gene *NtPox* uma peroxidase aniônica moderada. Os quatro genes foram avaliados em raízes de plantas transgênicas de arabidopsis tratadas com Al^{3+} , quanto à deposição de calose e crescimento radicular, constatando-se que sua toxidez diminuiu em todas as plantas.

O alumínio é capaz de interagir com diversas estruturas intra e extra celulares. Consequentemente, diversas hipóteses tem sido formuladas para explicar os mecanismos de toxidez. É importante ressaltar que até recentemente, não havia nenhuma evidência concreta a favor de uma hipótese em particular. Em parte, isso se devia ao fato de não saber com exatidão onde o Al se acumulava nas células do ápice radicular.

1.4 Proteínas de plantas contendo o domínio LIM.

O nome LIM é a combinação das iniciais dos nomes das primeiras proteínas onde o motivo foi identificado (Weiskirchen et al., 1995). O Lin-11 de *Caenorhabditis elegans* (Freydt et al., 1990), Isl-1 de rato (Karlsson et al., 1990) e Mec-3 de *C. elegans* (Way & Chalfie, 1988).

O domínio LIM é uma sequência de aminoácidos rica em cisteína à qual íons de zinco (Zn^{2+}) estão ligados (o grupo SH da cisteína é o ligante) e está presente em diversas proteínas com várias funções incluindo fatores de transcrição, reguladores da expressão gênica, arquitetura, adesão e mobilidade celular, produtos de proto-oncogenes, componentes do citoesqueleto, e transdução de sinais (Kadrmas et al., 2004). Além disso, são reconhecidos como componentes primordiais na regulação da maquinaria celular (Pawson et al., 2003) e apresentam diversas funções em processos biológicos como adaptadores, competidores, autoinibidores ou localizadores (Cyert et al., 2001).

No genoma humano existem 135 domínios LIM identificados, os quais estão presentes em 58 genes. O número de domínios LIM com proteínas conhecidas varia de 1 a 5, podendo estar associado com vários outros domínios funcionais como os homeodomínios de fatores de transcrição, nucleares (LMO), o domínio da proteína quinase (Lmk1, Lmk2), regiões envolvidas em interações proteína-proteína; proteínas variando em número de domínios e identificadas principalmente no citoplasma, entre outros (Taira et al., 1994; Wadman et al., 1997). Embora os genomas de organismos como leveduras e plantas codifiquem poucas proteínas LIM, todos os eucariotos que possuem seu genoma caracterizado apresentam proteínas com este domínio. Em procariotos, estas proteínas não foram identificadas.

Adicionalmente, além da interação proteína-proteína, verificou-se que diversas proteínas com domínio LIM podem se ligar “in vitro” inespecificamente ao DNA ou ao RNA, sendo que os domínios LIM são necessários para que haja esta interação (Baltz, 1996; Nishiya et al., 1998).

Sabe-se que algumas proteínas com domínios LIM de humanos apresentam afinidade pela actina. Em plantas, as proteínas LIM foram descritas em girassol, arabidopsis, tabaco e eucalipto (Baltz et al., 1992; Mundel et al., 2000; Kawaoka et al., 2000; Thomas et al., 2006; Kawaoka et al., 2006). Em girassol as proteínas PLIM-1 (Baltz et al., 1996) e WLIM-1 (Baltz et al., 1999), estão relacionadas estruturalmente às proteínas animais CRP1, CRP2 e CRP3/MLP,

consideradas componentes essenciais na organização da actina do citoesqueleto (Sadler et al., 1992; Pomiès et al., 1997). Além disso, a proteína PLIM-1 localiza-se em pequenas estruturas citoplasmáticas, os micrósporos e na região cortical dos grãos de pólen maduros, na qual concentra-se grande quantidade de actina e a proteína WLIM-1 foi encontrada em órgãos vegetativos e reprodutivos, tendo sua expressão localizada no núcleo e no citoplasma, associando-se frequentemente aos plastídios que são cercados por microfilamentos de actina (Baltz, 1999). Em tabaco, NTLIM-1 foi caracterizada como uma proteína ligante de DNA *in vitro*, sugerindo que os domínios LIM podem estar envolvidos com as atividades ligantes de DNA, ligando-se, neste caso específico, ao Pal-Box. Plantas transgênicas de tabaco expressando o *Ntlm-1* antisense, mostraram redução no nível dos transcritos de alguns genes principais envolvidos na via dos fenilpropanóides, como a fenilalanina amônia-liase (PAL), a 4-hydroxicinamato CoA ligase (4CL) e a cinamil álcool desidrogenase (CAD) apresentando 27% de redução no conteúdo de lignina (Kawaoka et al., 2000). Apenas um estudo envolvendo estresse em proteínas LIM foi realizado, descrito por Tranbarger et al. em 2003. Estes autores verificaram que o nível do transcrito *AtL2* na presença de 10 mmol.L⁻¹ KNO₃ foi reduzido em aproximadamente 40% e a expressão de *AtL2* foi preferencialmente localizada nas raízes. Thomas et al. (2006), caracterizaram WLIM1 como uma nova proteína ligante de F-actina envolvida no remodelamento da actina do citoesqueleto. Observaram ainda que a superexpressão de WLIM1 em células da epiderme de folhas de tabaco por agroinfiltração causou uma redução dramática no número de feixes de actina e no afinamento dos mesmos.

O citoesqueleto é uma rede dinâmica de componentes protéicos que consiste principalmente de microtúbulos e microfilamentos. Ambos os componentes do citoesqueleto estão envolvidos em uma ampla variedade de funções celulares, tais como divisão celular, expansão celular, a síntese da parede celular, movimento das organelas, o crescimento do ápice da raiz. Compostos que perturbam o funcionamento normal do citoesqueleto contribuem para a

inibição do crescimento e o entumescimento do ápice da raiz, semelhantes aos sintomas visuais de rizotoxicidade (Baskin et al., 1994; Baluska et al., 1996; Baskin e Wilson, 1997). Além disso, uma reorientação nos microtúbulos do citoesqueleto está associada ao crescimento alterado nas raízes em resposta a diversos fatores como o estresse osmótico (Blancaflor & Hasenstein, 1993, 1995a) e tratamentos hormonais (Baluska et al., 1993a; Blancaflor & Hasenstein, 1995b). Portanto, a inibição do crescimento e o aumento no diâmetro radicular observado nas raízes expostas ao Al (Bennet et al., 1985; Ryan et al., 1993; Sasaki et al., 1996) sugerem que o citoesqueleto pode ser um alvo celular de fitotoxicidade do Al na planta.

Recentemente, Illés et al. (2006), demonstraram que há uma correlação entre toxidez de Al, endocitose, endossomas e reciclagem de vesículas nas células da zona de transição de *Arabidopsis*. Segundo Amenós e colaboradores (2009), a hipótese de uma relação estreita entre F-actina, transporte de auxina polar e respostas de plantas à toxidez ao Al ganhou sustentação a partir de estudos realizados por Ahad e Nick, em 2007, com mutantes de tabaco derivados de protoplastos que toleravam Al. Em um desses mutantes, que apresentava grandes quantidades de actina, observou-se que havia uma significativa promoção no transporte de auxina. Entretanto, a influência de mudanças no transporte de vesículas em variedades de plantas com diferentes níveis de tolerância ao Al, selecionadas no campo sob diferentes condições de solos ácidos, ainda merecia comprovação. Recentemente, Amenós et al. (2009), realizaram um estudo que analisou os efeitos de brefeldina A (BFA), um inibidor do transporte de vesículas, na resposta de raízes à toxidez de Al em duas variedades de milho (Cateto e 16x36) com diferentes níveis de tolerância a este elemento. A partir deste ensaio, observou-se um maior acúmulo de Al no interior das células dos ápices das raízes da variedade 16x36 (sensível ao Al) do que na variedade Cateto que é tolerante. Segundo os autores a actina do citoesqueleto e o transporte de vesículas foram os alvos primários para a toxicidade de Al nas raízes da variedade sensível.

Estes resultados dão sustentação à hipótese de que a ligação do Al na parede celular rica em pectina pode contribuir para a inibição reversível da elongação radicular. Alterações na F-actina devidas à indução por Al^{3+} foram mais evidentes na zona de transição distal da variedade sensível 16x36, onde o Al foi localizado no interior do nucléolo (Amenós et al., 2009).

Considerando-se que existem diversos relatos atestando que o Al causa lesões no citoesqueleto (Sasaki et al., 1997, Blancaflor et al., 1998, Sivaguru et al., 1999; Amenós et al., 2009), pode-se especular que as proteínas com domínios LIM podem estar envolvidas na resposta ao Al. Além disso, observou-se que, aparentemente, o Al interage com fatores que influenciam a organização do citoesqueleto como os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} (Jones et al., 1998), Mg^{2+} e calmodulina (Grabski et al., 1998), o potencial elétrico da superfície celular, formação de calose e modificação na composição de lipídeos da membrana plasmática. Sendo assim, considerando-se que o Al na célula causa danos ao citoesqueleto, formulou-se a hipótese, nesta tese, de que a proteína *Zmlim-1* poderia amenizar os efeitos deletérios do Al ao impedir ou minimizar seus efeitos sobre o citoesqueleto.

Devido à ampla gama de funções atribuída a proteína LIM, a caracterização do gene *Zmlim-1* permitirá um melhor entendimento desta proteína na planta de milho e sua possível importância na tolerância ao Al.

1.5 Justificativa

A toxidez por alumínio (Al) é o principal fator limitante da produção agrícola em grandes áreas do Brasil e do mundo. O mecanismo de defesa das plantas a esse elemento parece ser controlado por múltiplos genes. Vários mecanismos de tolerância ao Al têm sido propostos, mas ainda não é conhecido o papel da maioria dos genes na resistência ao Al. A caracterização de genes cuja expressão é induzida pelo Al contribui para compreender as defesas ativadas pelas plantas. Dada à complexidade envolvida nos mecanismos de tolerância e resistência ao alumínio,

e conhecendo-se a associação do citoesqueleto como possível regulador desta toxidez, o estudo de genes pertencentes à família multigênica LIM poderá esclarecer os mecanismos de toxidez/tolerância ao Al. Considerando-se que proteínas LIM apresentam envolvimento com a regulação e dinâmica do citoesqueleto, tendo sido caracterizadas principalmente como proteínas ligantes de actina (ABP) e fator transcricional, e que a actina do citoesqueleto e o tráfego de vesículas foram alvos primários da toxidez por alumínio em raízes de milho de uma variedade sensível, o estudo da função do gene *Zmlim-1* torna-se bastante interessante. Devido à ampla gama de funções atribuídas a proteínas com domínios LIM, não é possível estabelecer uma função exata para *Zmlim-1* nas plantas de milho. Sendo assim, um amplo conjunto de metodologias foi utilizado para caracterizar o gene *Zmlim-1* e a proteína codificada.

1.6 Objetivos

Este trabalho teve como objetivo geral caracterizar o gene *Zmlim-1* e sua possível importância na tolerância ao Al^{3+} em milho empregando diversas estratégias. Em concreto propõe-se a:

1. Caracterizar a expressão gênica estudando sua indução em resposta a Al e via hibridização *in situ*;
2. Determinar a localização subcelular da proteína ZMLIM-1 fusionada à proteína GFP;
3. Identificar possíveis interações da proteína ZMLIM-1 com outras proteínas através do sistema de duplo híbrido em leveduras;
4. Avaliar fenotipicamente plantas de milho que superexpressam o gene *Zmlim-1*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

As linhagens Cat100-6 e S1587-17, tolerante e sensível ao Al respectivamente, ambas do banco de germoplasma da Unicamp, foram utilizadas no projeto. Essas linhagens têm sido amplamente caracterizadas quanto à tolerância ao Al (Moon et al., 1997; Boscolo et al., 2003; Cançado et al., 2005; Jorge e Menossi, 2005).

Plantas de milho das linhagens temperadas (A-188 e HiII) foram cultivadas em casa de vegetação da EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG e CBMEG/Unicamp, respectivamente, sob condições de umidade e temperatura controladas. Embriões imaturos foram excisados de espigas de 12 a 15 dias após a polinização, inoculados em meio de cultura e mantidos no escuro a 25°C para indução de calos embriogênicos e posterior bombardeamento com as construções gênicas.

2.2 Avaliação da expressão do gene *Zmlim-1* frente à indução por alumínio

Sementes de milho dos genótipos Cat100-6 (tolerante) e S1587-17 (sensível) foram germinadas em rolos de papel de germinação autoclavado e mantidas no escuro a temperatura constante de 26°C por um período de três dias. Após a germinação, parte das sementes foi transferida para recipientes plásticos opacos contendo 250 ml de solução nutriente completa (Magnavaca, 1987). O pH da solução nutritiva foi ajustado para 4,0 com HCl. A solução nutritiva de Magnavaca: 10900 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{NO}_3^-$ (KNO_3 e NH_4NO_3), 3500 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{Ca}^{2+}$ (CaSO_4 e CaCl_2), 2300 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{K}^+$ (KNO_3 e KCl), 1300 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{NH}_4^+$ (NH_4NO_3), 850 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{Mg}^{2+}$ (MgSO_4), 590 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{S-SO}_4^{2-}$ (sais de sulfato), 590 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{Cl}^-$ (sais de cloreto), 25 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{B-BO}_3^{-3}$ (H_3BO_3), 9,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{Mn}^{2+}$ ($\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$), 2,29 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{Zn}^{2+}$ ($\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,88 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{Mo-MoO}_4^{2-}$ (Na_2MoO_4), 0,63 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{Cu}^{2+}$ ($\text{CuSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$), 77 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{Fe}$ (FeEDTA).

A esta solução foram acrescentadas soluções de alumínio, preparadas a partir de AlCl_3 , de forma a conter 0; 5; 15; 50 e 85 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{Al}^{3+}$, valores em atividade de Al^{3+} livre. Os resultados foram verificados após 24h de exposição

2.3 Ensaio de expressão via *northern blot*

2.3.1 Extração de RNA

Todo material utilizado foi queimado ou tratado com água DEPC (solução aquosa contendo 0,1% v/v dietil pirocarbonato) por 15 minutos, deixando-os livres de RNase. Após o período de estresse em solução hidropônica, realizou-se a extração do RNA total de ápices de milho das linhagens Cat100-6 e S1587-17, segundo o procedimento descrito por Logemann et al. (1987). Cerca de 10-12 ápices de milho por amostra foram macerados no próprio tubo eppendorf com 300 μl de tampão de extração (50 m mol.L^{-1} Tris HCl pH 8,0; 20 mmol.L^{-1} EDTA pH 8,0; 50 m mol.L^{-1} β -mercaptoetanol; 8 mol.L^{-1} guanidina HCl) e uma pitada de sílica (SiO_2). Após macerar, completou-se o volume com a solução-tampão de extração para 700 μl , homogenizou-se, adicionou-se 700 μl de solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1 v/v) e misturou-se por inversão.

Centrifugou-se a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C e recuperou-se a fase superior, à qual adicionou-se o mesmo volume (700 μl) de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) e misturou-se por inversão. Centrifugou-se por 15 minutos a 12000 rpm a 4°C e recuperou-se a fase superior. O RNA foi precipitado durante aproximadamente 18 horas a -20 °C, com 0,2 vol. de 3 mol.L^{-1} acetato de sódio pH 5,2 e 1 volume de etanol absoluto gelado. Em seguida, centrifugou-se por 10 minutos em microcentrífuga em temperatura ambiente e lavou-se o *pellet* com etanol 70%. Após a completa evaporação do etanol, ressuspendeu-se o *pellet* em H_2O tratada com DEPC e armazenou-se no freezer a -70°C.

O RNA foi posteriormente quantificado através de leitura da absorbância das amostras a 260 nm em espectrofotômetro. A qualidade do RNA foi verificada através de eletroforese em gel de agarose contendo formaldeído como agente desnaturante (Sambrook et al., 1992).

2.3.2 Hibridização

O RNA foi transferido por capilaridade para membranas de nylon (Hybond N, GE Healthcare, EUA) em solução SSC 10X durante a noite e em seguida fixado nas membranas por incubação a 80°C por 2 h. As membranas foram pré-hibridizadas por 4 horas a 42°C em solução contendo formamida deionizada 50%, SSC 5X, Denhardt's 5X, 50 mmol.L⁻¹ fosfato de sódio pH 6,8, solução de 1%SDS e 500 µg.ml⁻¹ de DNA de esperma de salmão desnaturado. As sondas foram marcadas com dCTP ^α³²P através do kit “*Ready-to-go DNA labeling beads*” (GE Healthcare), desnaturadas e adicionadas à solução. A hibridização foi conduzida a 42°C durante a noite em solução contendo 50% formamida, SSC 5X, Denhardt's 5X, 20 mmol.L⁻¹ fosfato de sódio pH 6,8, solução 1% SDS e 5% sulfato de dextrana. No dia seguinte as membranas foram lavadas por 20 min em 0,1% SDS, 0,2X SSC a temperatura ambiente, e uma segunda vez na mesma solução a 65 °C, sendo em seguida, seladas e expostas a *Imaging Plate* (IP) em cassette.

2.4 Hibridação *in situ*

As ribossondas foram preparadas a partir do plasmídeo pGEM-Teasy (Promega, EUA) contendo a região denominada p2a, correspondente à região 3'UTR do gene *Zmlim-1*, visto que esta região é específica deste gene. Este plasmídeo foi linearizado nos sentidos sense e antisense, em seguida, realizou-se a marcação da sonda utilizando-se o “*DIG-RNA labeling Kit SP6/T7*” (Roche, EUA), como descrito pelos fabricantes. As raízes da linhagem Cat100-6 foram fixadas em FAA (50% etanol, 10% formaldeído e 5% de ácido acético) durante a noite a 4°C, desidratados em séries de etanol e embebidos em ParaplastPlus (Sherwood Medical, EUA).

Os cortes foram feitos em micrótomo (8-10 μm), acondicionados em lâminas ProbeOn Plus (Fischer Scientific, EUA), desparafinizados em xileno, reidratados e tratados com proteinase K (1mg.mL⁻¹). Em seguida, foram incubados durante a noite à 42°C em tampão de hibridização contendo as respectivas sondas (5 mg/mL). Os cortes foram lavados duas vezes em solução 4x SSC, e duas vezes em solução 2x SSC a 42 °C por 30 min, seguido da solução DB1 (Tris 0,1mol.L⁻¹ pH 7,5 e 5mol.L⁻¹ NaCl). Para a detecção imunológica os cortes foram incubados no reagente de bloqueio 0,5% por 1 hora e depois com o anticorpo *anti-DIG-alkalinephosphatase conjugate* (1:1000) diluído em 0,5% de BSA durante 1 hora em temperatura ambiente. A reação colorimétrica foi feita com 338 mg.mL⁻¹ NBT, 175 mg.mL⁻¹ BCIP, diluídos em DB1, durante a noite à temperatura ambiente em uma câmara escura. Os cortes foram reidratados em séries de etanol e montados com Permount (Fischer Scientific, EUA). As lâminas foram visualizadas e fotografadas num microscópio Zeiss Axiovert 40 (Zeiss, Alemanha).

2.5 Construção dos cassetes de expressão

2.5.1 Síntese de cDNA

Para a realização da síntese de cDNA, foram coletadas aproximadamente 5-10 mm de ponta de raízes da linhagem CAT100-6 germinadas durante 5 dias em B.O.D. a 27 °C. Cada amostra de RNA foi constituída por 12 ápices radiculares previamente armazenados a -70 °C. A extração foi feita com guanidina e 0,1 mol.L⁻¹ Tris-HCl pH 8,3, 0,5 mol.L⁻¹ KCl, 15 m mol.L⁻¹ MgCl₂ e 1 μl de DNase (10 U/ μl) em um volume final de 100 μl , a 37°C por 1 hora. Depois, adicionaram-se às amostras 100 μl de água e 200 μl de fenol:clorofórmio (3:1 v/v). As amostras foram agitadas com um vortex e centrifugadas por 3 minutos; as fases superiores foram recuperadas e precipitadas com 20 μl de acetato de sódio 3 mol.L⁻¹ (pH 5,2), 480 μl de etanol absoluto e centrifugação por 10 minutos.

Os *pellets* foram lavados com etanol 70% e ressuspensos em 20 µl de água. Para a reação de síntese, 1 µg do RNA foi transferido para 2 µl de *primer* p2A (2 picoMol) e 1 µl de DNTPS (10 mmol.L⁻¹), num volume final de 10 µl. Após incubação por 10 minutos a 65°C, a amostra foi transferida para banho de gelo por 3-4 minutos. Adicionaram-se 2x first strand, 0,1 mol.L⁻¹ DTT e 1 µl RNase out, mantendo-se o produto a 55°C durante 5 minutos. A esta reação adicionou-se 1 µl super script III mantendo-a a 55°C por 40 minutos e novamente 1µl da enzima super script III (Invitrogen, EUA) . Em seguida, a transcriptase reversa foi inativada por 10 minutos a 70°C. O cDNA foi armazenado a -20°C.

2.5.2 PCR a partir do cDNA

Em tubos eppendorf de 0,25 ml, adicionaram-se 2 µl do cDNA em uma mistura de reação contendo 1 µmol.L⁻¹ do *primer* LIM 5' (CACCGAGCTCGCCATGGCGACCTCCTT), 1 µmol.L⁻¹ do primer LIM3' com stopcódon (CCATGGTTCAGTGATCAATACTCATGTTCATCCT) ou 1 µmol.L⁻¹ do primer LIM3' (CCATGGGTGATCAATACTCATGTTCATCCT), 1x tampão de *Taq* polimerase, 25 mmol.L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol.L⁻¹ 4 dNTPs, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase, num volume final de 50 µl. As reações foram realizadas através de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação à 94°C por 45 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos (a temperatura varia conforme o par de oligonucleotídeos) por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e de uma última etapa de extensão a 72°C por 5 minutos. O sequenciamento do DNA foi realizado segundo a metodologia Dye Terminator (*Big Dye Kit*, Perkin Elmer, USA) e analisado com o BLAST no servidor NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

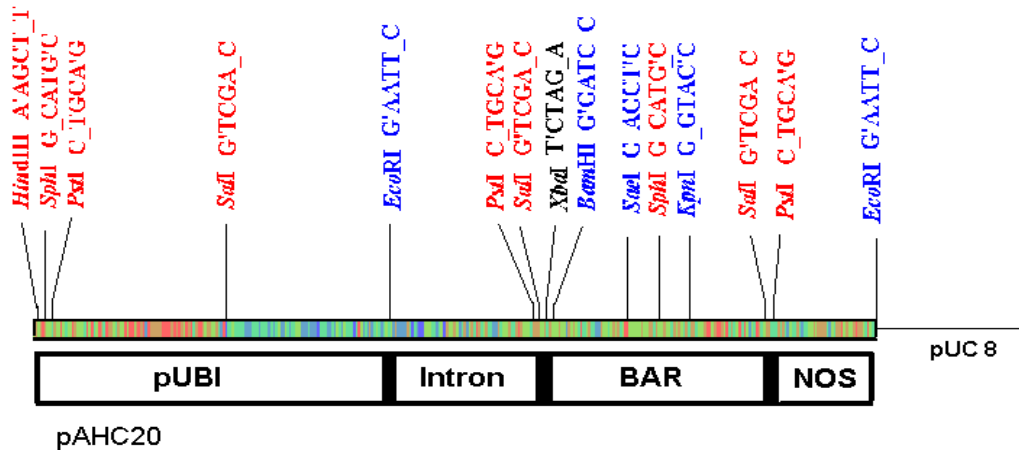


Figura 2. Representação esquemática do plasmídeo pAHC20 (5520pb), contendo a região promotora pUBI, intron, gene de seleção BAR, terminador NOS, sequência do PUC 8. BAR, fosfinotricina acetiltransferase.

2.6 Determinação da localização subcelular da proteína *Zmlim-1*

2.6.1 Amplificação e clonagens do gene *Zmlim-1* visando fusão com o gene *gfp*

Uma vez obtido o cDNA de raiz de milho, foi realizada a amplificação do gene *Zmlim-1* utilizando-se os oligonucleotídeos *forward*, desenhados para permitir a amplificação a partir do ATG que codifica o aminoácido metionina do início da síntese protéica (5" CACCGAGCTCGCCATGGCGACCTCCTT 3"), e o oligonucleotídeo *reverse*, desenhado com a remoção do sítio *stop* dos CDS para a subsequente fusão na extremidade N-terminal da proteínaGFP (*primers* reverso 5" CCATGGGTGATCAATACTCATGTTTCATCCT 3").

Outra característica do oligo *forward* é a presença dos nucleotídeos 5" CACC 3" na extremidade 5", necessários para a realização da clonagem direcional no vetor pENTR/D-TOPO. Obtido o CDS, foi realizada a clonagem no vetor de entrada pENTR/D-TOPO compatível com o sistema *Gateway* (Invitrogen, Brasil). Esta construção foi então recombinada com o vetor *p2GWF7* (Karimi et al., 2002), obtendo-se assim, a fusão da proteína GFP na extremidade amino terminal.

O sistema gateway baseia-se na utilização de vetores que possuem as bordas *attR1* e *attR2* necessárias para a incorporação do gene *Zmlim-1* via recombinação. O vetor p2GWF7 possui estas bordas e o gene marcador fluorescente GFP na região amino terminal, facilitando a fusão do *Zmlim-1* à proteína verde fluorescente (Figura 3). Este vetor foi adquirido da *Functional Genomics Division of the Department Plant Systems Biology* (VIB-Ghent University).

O protocolo padronizado para a clonagem no vetor de entrada pENTR/D-TOPO foi estabelecido como uma reação contendo 1 µl do produto de PCR, 1 µl da solução de sais, 3 µl de H₂O estéril e 1 µl do vetor TOPO, sendo iniciada a transformação das bactérias competentes após 10 minutos em temperatura ambiente. Já para a recombinação com os vetores de destino foi estabelecida a reação da seguinte forma: 1 µl do DNA da clonagem no TOPO, 1,5 µl do DNA do vetor de destino, 5,5 µl de T.E. (pH 8,0) e 2 µl da enzima clonase. Incubou-se esta reação a 25°C por duas horas e meia, sendo que após este período adicionou-se 1 µl de proteinase K e incubou-se a 37°C por 10 minutos antes de iniciar a transformação das bactérias competentes. A confirmação das clonagens foi realizada por PCR utilizando os *primers* específicos, por digestão enzimática com as enzimas *MluI* (confirmando a clonagem no pENTR/D-TOPO) e *PstI* (confirmando a clonagem no p2GWF7), assim como por sequenciamento, através do qual temos a possibilidade de verificação da sequência que foi clonada.



Figura 3. Construção p2GWF7 utilizada na expressão transiente. A fusão amino-terminal (Vetor p2GWF7). p35S (DeLoose *et al.*, 1995); Egfp (*Enhanced fluorescence protein*, Clontech, EUA); attR1 e attR2, sítios de recombinação, e CmR-ccdB, gene marcador de resistência, (Invitrogen, Brasil); t35S (Goddijn *et al.*, 1993).

2.6.2 Transformação de epitélio de cebola

Nas transformações de epitélio de cebola (*Allium cepa*) utilizamos o sistema de transformação gênica por biobalística de hélio (Bio-Rad, EUA), amplamente usado para a determinação da localização subcelular (Scott et al., 1999). O tecido a ser transformado epiderme de cebola de aproximadamente 2x2 cm, foi depositado em placas de petri contendo papel de germinação umedecido com água. Em seguida, realizou-se a precipitação do DNA em micropartículas de tungstênio. Sendo assim, cinco microgramas do DNA plasmidial purificado em coluna (Qiagen, EUA) foram precipitados sobre partículas de tungstênio (Bio-Rad, EUA) usando CaCl_2 e espermidina (Sigma, EUA) tal como descrito por Menossi et al. (1997). As partículas revestidas com DNA foram então lavadas em etanol absoluto, ressuspensas em etanol, e usadas para o bombardeamento do tecido em 1200 psi.

2.6.3 Visualização da localização subcelular das proteína ZMLIM-1

A avaliação da localização subcelular foi realizada em microscópio de fluorescência modelo Leica DMI4000 (Leica, Alemanha), visando à detecção da emissão da GFP (com filtro de 505 a 550 nm). A captura digital das imagens foi realizada com o software Leica IM50 (Leica, Alemanha).

2.7 Determinação das interações da proteína utilizando o sistema de duplo híbrido em leveduras

Com o objetivo de entender o funcionamento molecular do gene *Zmlim-1* e avaliar o papel da proteína e suas possíveis interações, utilizou-se a técnica de duplo híbrido em leveduras. Para isto foi necessário construir uma biblioteca de cDNA de milho. Optou-se por construir a biblioteca de cDNA a partir de ápices de milho estressados por Al^{3+} já que o gene *Zmlim-1* foi induzido por Al e isto permitiria uma especificidade maior na localização das proteínas que

interagem. Todos os experimentos de duplo-híbrido foram conduzidos de acordo com as instruções do fabricante do kit “*BD Matchmaker Library Construction and Screening Kit*” (Clontech, EUA). O ensaio foi realizado segundo a bibliografia relacionada com este sistema (Gentile et al., 2009; Causier e Davis, 2002; Wang et al., 2000; Inamoto et al., 1997). Este kit incorpora algumas melhoras ao sistema simples de duplo híbrido com GAL4, fazendo que seja de fácil utilização e com bons resultados. Este sistema utiliza cepas de leveduras AH109, que contém quatro genes repórter (ADE2, HIS3, *lacZ* e MEL1), integrados no genoma do hospedeiro em diferentes regiões e com diferentes elementos promotores. Assim, é possível eliminar automaticamente três categorias de falsos positivos: aqueles produzidos por interação da proteína acima da construção do repórter, aqueles que interagem direto com as seqüências que flanqueiam ao sítio de união da GAL4 e aqueles que interagem com fatores de transcrição unidos a caixas TATA específicas. Os plasmídeos utilizados neste sistema foram o pGBKT7 (que tem o domínio de união ao DNA da GAL4) com resistência a kanamicina, e o pGADT7 (que tem o domínio de ativação da GAL4) com resistência a ampicilina. Na Figura 4 são mostrados os mapas destes plasmídeos. Uma breve descrição de cada etapa será apresentada.

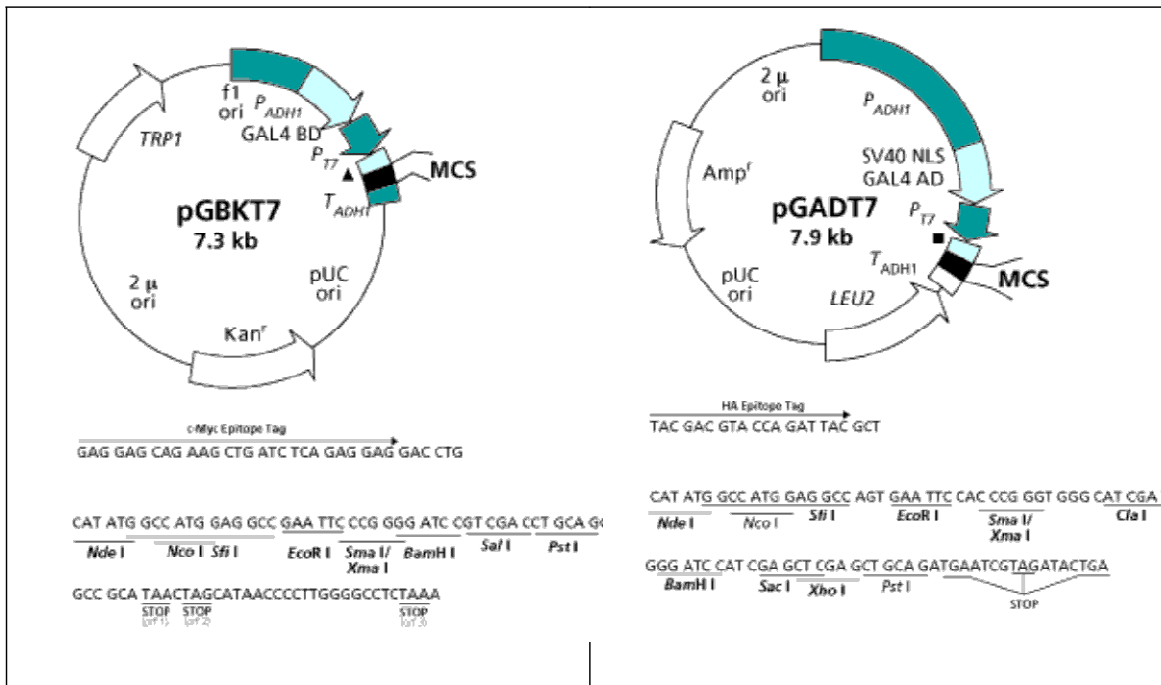


Figura 4. Mapa que mostra os dois plasmídeos utilizados no ensaio de duplo híbrido. Estes plasmídeos são parte do BD Matchmaker Library Construction and Screening Kit (Clontech, EUA).

2.7.1 Clonagem do gene *Zmlim-1* em pGBKT7

A região codificante completa do gene *Zmlim-1* foi isolada do vetor pUBILIM e clonada no vetor pGBKT7 (Figura 4) de acordo com técnicas padrão de biologia molecular. O vetor pGBKT7 permite a fusão “in frame” com o domínio de união ao DNA da proteína GAL4.

2.7.2 Verificação da ativação dos genes repórteres e da toxicidade em levedura

A construção pGBKT7/*Zmlim-1* foi inserida em células de levedura das cepas AH109 (MAT α , *trp1-901*, *leu 2-3*, 112, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATA- HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-*lacZ*; James et al., 1996) e Y187 (MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu 2-3*, 112, *gal4Δ*, *met*, *gal80Δ*, URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-*lacZ*; Harper et al., 1993) e testada para verificar a possível ativação da transcrição dos genes repórter isoladamente pela proteína ZMLIM-1.

Como proteínas de domínio LIM já foram caracterizadas como um fator de transcrição existia este risco, o que tornaria inviável a realização dos experimentos de duplo-híbrido.

2.7.3 Construção da biblioteca de cDNA de plantas de milho submetidas à estresse por alumínio

Utilizou-se RNA de plantas de milho da variedade Cat100-6 submetidas ao estresse em solução hidropônica contendo Al^{3+} por 48 horas, para a síntese de cDNA de alta qualidade. Este cDNA foi obtido com o auxílio da pesquisadora Dra. Agustina Gentile. O cDNA amplificado por PCR e purificado (fragmentos > 500pb) foi clonado por recombinação no vetor pGADT7-Rec na cepa de levedura AH109, de acordo com as instruções do kit Matchmaker (Clontech, EUA). O vetor pGADT7-Rec permite a fusão “*in frame*” com o domínio de ativação de GAL4.

2.7.4 Análise da interação por *mating type*

A cepa Y187, contendo pGBKT7/ZMLIM-1, e a cepa AH109, contendo a biblioteca de cDNA em pGADT7-Rec, foram recombinadas em meio de cultura rico (2x YPDA/Kan 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) para que ocorra o *mating type* entre as diferentes cepas. As cepas foram incubadas a 30°C por 20-24 hs com agitação leve (30-50 rpm). Após 20 horas, uma gota da solução foi checada ao microscópio (Leica DMI 4000, Leica, Alemanha) para certificar a formação de zigotos. A partir dos zigotos contendo os 2 plasmídeos, as leveduras foram centrifugadas e ressuspensas em meio 0,5X YPDA/Kan 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

2.7.5 Identificação de clones positivos

As leveduras ressuspendidas em meio 0,5X YPDS/Kan 50µg/µL foram plaqueadas em meio seletivo SD que não possui leucina e triptofano (-Leu, -Trp), para seleção somente de células que possuem os dois vetores; nem adenina e histidina (-Ade, -His), para a seleção somente de células onde esteja ocorrendo a interação entre a proteína ZMLIM-1 e uma proteína da biblioteca. Esta interação vai aproximar o domínio de ligação ao DNA de GAL4 e o domínio de ativação de GAL4, permitindo a reconstituição de sua atividade e a ativação da transcrição dos genes repórter para síntese de adenina e histidina. Várias colônias foram obtidas neste screening, as quais foram transferidas para meio seletivo contendo X-alfa-Gal a fim de verificar a ativação de um terceiro gene repórter, o qual permite a formação de colônias de coloração azul. Estas colônias devem ser re-transferidas para meio seletivo com X-alfa-Gal pelo menos duas vezes, para auxiliar na eliminação de falsos-positivo. Os clones positivos foram facilmente identificados em placas selecionando colônias brancas/azuis pela adição de X-alfa-Gal no meio, substrato da β -galactosidase.

2.8 Transformação genética de milho superexpressando o gene *Zmlim-1*

2.8.1 Produção de calos embriogênicos

Plantas de milho da linhagem A-188 e HiII foram cultivadas na casa de vegetação do CBMEG/UNICAMP, sob condições de umidade (60%) e temperatura (26 a 28°C) controladas. Embriões imaturos foram excisados das espigas de 12 a 15 dias após a polinização, mantidos em meio de cultura de indução (sais N₆ + vitaminas N₆ + 2,9 g.L⁻¹ de prolina+ 100mg.L⁻¹ de caseína enzimática + 3% sacarose + 0,25% phytigel + 1,7mg.L⁻¹ AgNO₃ + 2 mg.L⁻¹ 2,4-D) e mantidos no escuro a 25°C. Após 20 dias de cultura os explantes que demonstraram respostas embriogênicas, foram selecionados para o estabelecimento de culturas cíclicas quinzenais no mesmo meio de cultura.

2.8.2 Transformação genética de calos via biobalística

As condições para o bombardeamento das culturas embriogênicas foram as mesmas descritas por Kemper et al. (1999). O bombardeamento foi realizado com o emprego de um canhão de hélio (Biomica, Brasil). A construção pUBILIM foi utilizada em co-transformação com o vetor pAHC20. Após o bombardeamento as células foram mantidas por quinze dias em meio de descanso (N6 modificado, sem agente seletivo). Os calos foram transferidos para 3 subcultivos realizados a cada 15 dias, com ciclos em meio de seleção denominados SM (sais N₆ + vitaminas N₆ + 3% sacarose + 0,25% phytigel + 1,7 mg.L⁻¹ AgNO₃ + 2 mg.L⁻¹ 2,4-D + doses crescentes de ppt), SM1 contendo 3 mg.L⁻¹ glufosinato de amônia, SM2 (presença de 6 mg.L⁻¹ glufosinato de amônio) e SM3 (9 mg.L⁻¹ glufosinato de amônio), na ausência completa de luz, permanecendo por cerca de quinze dias em cada meio seletivo. Posteriormente, os calos remanescentes foram transferidos para meio de maturação contendo 2,4-D (1 mg.L⁻¹) e 6 mg.L⁻¹ glufosinato de amônio por um período de duas semanas. Nesta fase os calos foram cultivados na presença de luz para estimular a diferenciação celular. Em seguida os calos foram mantidos no escuro em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) constituído de sais MS + vitaminas MS + 100 mg.L⁻¹ inositol + 0,2 mg.L⁻¹ ANA + 6% sacarose + 0,25% phytigel. Após a maturação os calos foram colocados em meio de cultura MS (sais MS + vitaminas MS + 100 mg.L⁻¹ inositol + 3% sacarose + 0,25% phytigel) em presença de luz para obtenção das plântulas transformadas.

A aclimatização das plantas foi realizada após formação de raízes *in vitro*, mantendo as plantas em potes com vermiculita autoclavada e solo (1:1, p/p) e cultivadas em câmara de crescimento sob condição de umidade relativa 100%. Em etapa posterior, as plantas transformadas foram transferidas para solo e cultivadas em casa de vegetação. Para selecionar essas plantas, foi aplicado o herbicida BASTA (fosfotricina) em uma faixa de 5 cm de uma das

folhas e a partir da observação dos sintomas foliares foi possível discriminar os fenótipos tolerante e sensível.

2.9 Extração e análise do DNA genômico

A extração de DNA das plantas T0 e T1 foi feita segundo o procedimento do CTAB descrito por Doyle e Doyle (1987). Folhas de plantas no fim do desenvolvimento foram coletadas e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido. Aproximadamente 3 g de tecido foram macerados em cadinho com nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino e então transferido para um tubo contendo 5 ml de tampão de extração (0,1 mol.L⁻¹ Tris-HCl pH 8,0; CTAB 2%; 0,02 mol.L⁻¹ EDTA; 1,4 mol.L⁻¹ NaCl e β-mercaptoetanol 0,2%) pré aquecido a 65°C. Após a incubação deste material a 65°C por 1,5h foram feitas duas extrações com 1 volume de fenol:clorofórmio (24:1, v/v). O DNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol, lavado com 1 ml de etanol 70%, seco a temperatura ambiente e ressuspensionado em 100 µl de TE (10 mmol.L⁻¹ Tris-HCl pH 8,0; 1 mmol.L⁻¹ EDTA pH 8,0).

2.9.1 Southern blot

Um total de 2 folhas das plantas foram utilizadas para obter 20 - 30 µg de DNA. A reação de digestão foi realizada com a enzima *PstI* a partir de 15 a 20 µg de DNA, durante 20 h, a 37°C. A confirmação da digestão total do DNA foi feita por eletroforese a partir de uma alíquota da reação (3 µl), em gel de agarose (1%).

O DNA digerido foi precipitado em solução de acetato de amônio e álcool absoluto, mantendo-o em freezer a -20 °C, durante 24 h. Após a precipitação, todo o DNA digerido mais o azul de bromofenol foi separado em gel de agarose 1%, numa corrida a baixa voltagem (35 V/20 h) para separação dos fragmentos. O DNA contido no gel foi transferido para uma membrana de nylon (Hybond-N⁺, GE Healthcare, EUA) em um processo que durou 16 h. A membrana

contendo o DNA foi hibridizada com a sonda correspondente a sequência de DNA complementar ao gene *Zmlim-1* marcada utilizando-se o “*Random primer labelling kit*” (GE Healthcare, EUA).

2.9.2 Preparação da sonda para o *Southern blot*

A sonda foi preparada a partir da reação de PCR utilizando diversos conjuntos de *primers*. Inicialmente utilizaram-se *primers* para o gene *Zmlim-1*, em seguida o par *Zmlim-1::NOS* e apenas os *primers* NOS a fim de confirmar o número de cópias integradas no genoma de milho. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose e em seguida o fragmento correspondente a cada uma das sondas em questão foi purificado com auxílio do Kit “*Qiaex II gel extraction*” (Qiagen, EUA). A sonda foi preparada utilizando-se o “*Random primer labelling kit*” (GE Healthcare, EUA), seguindo-se as instruções do fabricante.

2.10 Ensaio de tolerância ao Al

2.10.1 Avaliação do crescimento radicular das plantas de milho em meio líquido

Sementes de plantas transgênicas superexpressando o *Zmlim-1* e sementes de plantas azigotas, foram esterilizadas em NaOCl 0,5% (v/v) por 15 min e lavadas em água destilada autoclavada por quatro vezes. As sementes foram germinadas em rolos de papel de germinação autoclavado, umedecidos com água destilada autoclavada e mantidas no escuro a 25°C por três dias.

Após a germinação, as plântulas foram transferidas para recipientes plásticos opacos contendo 250 ml de solução simples de $1\text{mmol.L}^{-1}\text{CaCl}_2$, pH 4,0 e previamente aerada. Desta vez optou-se por trabalhar com uma solução simples em substituição à solução nutritiva de Magnavaca. Esta solução simples favorece a ligação somente dos cátions Ca^{2+} e Al^{3+} no

apoplasto da raiz, evitando competição com outros cátions presentes em soluções completas, como por exemplo a de Magnavaca.

Utilizou-se solução de Al^{3+} recém-preparada a partir de $AlCl_3$ e padronizada de acordo com Kinnunem e Merikanto (1955). A atividade de Al^{3+} desejada foi estimada utilizando o programa computacional GEOCHEM-PC 2.0 (Parker et al., 1995). As plântulas foram mantidas a 26°C sob fotoperíodo de 16 h.

Avaliou-se a taxa de crescimento radicular através relação do crescimento líquido radicular (crescimento final – crescimento inicial) das plântulas expostas ao Al^{3+} dividido pelo crescimento líquido das plântulas controle (Jorge et al., 2001). As medições foram realizadas após um dia na presença ou ausência de Al.

2.11 Avaliação de expressão do gene *Zmlim-1* por qRT-PCR

2.11.1 Síntese de cDNA

As amostras de RNA foram tratadas com Dnase (Deoxyribonuclease I, Invitrogen) para remoção de possíveis resíduos de DNA genômico. A seguir, a reação de transcrição reversa foi realizada utilizando 1 µg de RNA total, transcriptase reversa (Superscript III, Invitrogen) e Oligo dT(12-18) primer (Invitrogen) em presença de inibidores de Rnase (Rnase OUT, Invitrogen) em um volume final de 20 µL, a ordem e as etapas de incubação foram realizadas de acordo com as recomendações de tempo e temperaturas do fabricante dos reagentes.

2.11.2 Eletroforese em gel de Agarose

Na fase de inicial de padronização da reação de PCR em tempo real, o produto das reações de PCR foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2% e corados com brometo

de etídio para a visualização e a confirmação da amplificação de um único produto em tamanho compatível com o esperado.

2.11.3 PCR em tempo real

As amplificações por PCR foram realizadas em triplicatas utilizando-se 20 ng de cDNA por reação. As reações foram preparadas para um volume final de 25µl utilizando-se os reagentes padronizados para PCR em tempo real, ou seja, 12,5 µl de SYBR Green, 6,5 µl de água MilliQ e 0,5 µl dos primers da região 3'UTR preparados na concentração de 10 nmol, primer FW (5'TGAGCACAACCACAGATGAATA 3') e RW (5'TACATGCAGATACAAGACAAC 3'), sendo que estes primers geram um amplicon de 81 pb. O mix foi depositado na placa óptica e em seguida adicionou-se o cDNA(5µl), vortexando-se por 10 segundos em velocidade baixa. A placa foi selada com adesivo óptico e depositada no ABI Prism 7000.

O gene utilizado como normalizador (controle endógeno) foi o gene da tubulina, com a sequência de primers FW 5' TGCCACTGCTATCCTGTGATCT 3' e Rw-5' GAACCGACAGAAACATAACACGAT 3'.

As condições da reação foram 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos e 40 repetições de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Em seguida 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 20 segundos e 95 °C por 15 segundos. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento ABI Prism 7000 Real-Time PCR (Applied Biosystems) a cada ciclo de amplificação e, posteriormente, analisados pelo Sequence Detection Software (SDS) v1.3 (Applied Biosystems).

A determinação dos níveis de expressão dos genes alvo foi realizada pela quantificação relativa (RQ), utilizando-se a equação $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Para cada tratamento, foi detectado o valor de C_T tanto para o gene alvo quanto para o normalizador. Esse valor representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectado. O valor do C_T do gene alvo é subtraído do valor do C_T do normalizador e resulta no valor de ΔC_T ; o valor de ΔC_T do gene alvo é,

então, subtraído do valor do ΔC_T do calibrador (controle não tratado), e é encontrado o valor de $\Delta\Delta C_T$. Este valor foi utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do normalizador, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência (Livak & Schmittgen, 2001).

A análise dos dados foi feita por estatística descritiva com o software Prism versão 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). A reprodutibilidade e precisão dos valores de RQ obtidos foram estimadas pelos desvios-padrão (SD) em cada corrida e entre as corridas

2.12 Avaliação do teor de lignina nas linhagens transgênicas

2.12.1 Avaliação anatômica via coloração por fluoroglucinol

Para a detecção de lignina em milho, amostras de raízes da porção superior foram selecionadas e cortadas a fresco (lâmina de barbear). Em seguida os cortes foram corados com solução de fluoroglucinol acidificado e as características referentes a quantidade de lignina foram visualizadas no microscópio de fluorescência modelo Leica DMI4000 (Leica, Alemanha). A captura digital das imagens foi realizada utilizando-se o software Leica IM50 (Leica, Alemanha).

2.12.2 Quantificação de lignina

Na extração de lignina foram usadas folhas de milho do controle selvagem (proveniente do cruzamento HiII vs B73) e folhas provenientes de quatro plantas transgênicas com perfil diferencial de integração via *southern blot*. As folhas foram coletadas de plantas bem desenvolvidas (três meses) quando a inflorescência já havia se desenvolvido. Os materiais vegetais colhidos foram macerados em nitrogênio líquido, liofilizados e enviados para análise de quantificação de lignina realizada na EMBRAPA/ São Carlos de acordo com os procedimentos descritos anteriormente, proposto por Van Soest (1987).

3 RESULTADOS

3.1 Clonagem do gene *Zmlim-1*

O *display* diferencial de mRNA (D.D.) é um método que demonstra bastante eficácia na identificação dos genes super ou sub-expressos em um tipo celular em comparação a outro (Liang e Pardee, 1992).

Esse método utiliza a transcrição reversa através dos oligonucleotídeos ancorados na cauda poliadenilada do mRNA. Estes oligonucleotídeos têm geralmente entre 12 e 15 bases, sendo formados de um poliT mais duas bases arbitrárias ($T_{12}VN$ onde $V=A, C$ ou G e $N=A, T, C$ ou G), tendo assim subpopulações de cDNA de acordo com a afinidade entre o *primer* ancorador e o mRNA. Estas subpopulações de cDNA serão amplificadas por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando-se os *primers* ancoradores e arbitrários. Um nucleotídeo radioativo é incluído na reação de PCR para que o produto possa, após separação em gel de seqüenciamento, ser visualizado por autoradiografia. Bandas presentes em apenas um tipo celular ou com diferente intensidade correspondem aos mRNA diferencialmente expressos. Estas bandas podem ser retiradas do gel, amplificadas com os mesmos oligonucleotídeos do D.D. inicial e o produto da PCR pode ser usado como sonda em *northern blotting* para confirmar a identificação dos mRNA diferentemente expressos (Sompayrac et al., 1995).

Utilizando essa técnica foi possível identificar um gene diferencialmente expresso em ápice e raiz, e em brotos (1-2 folhas iniciais). Sendo assim, esta banda foi eluída do gel, reamplificada e clonada (Figura 5A). Para avaliar a expressão deste transcrito em diferentes tecidos, realizou-se um *northern blot* a partir de diferentes tecidos: ápice, resto de raiz, brotos e folha adulta verificando-se que este gene foi expresso abundantemente nas raízes, ápice e brotos, mas não apresentou expressão em folhas adultas (Figura 5B) podendo estar associado a diversas funções celulares.

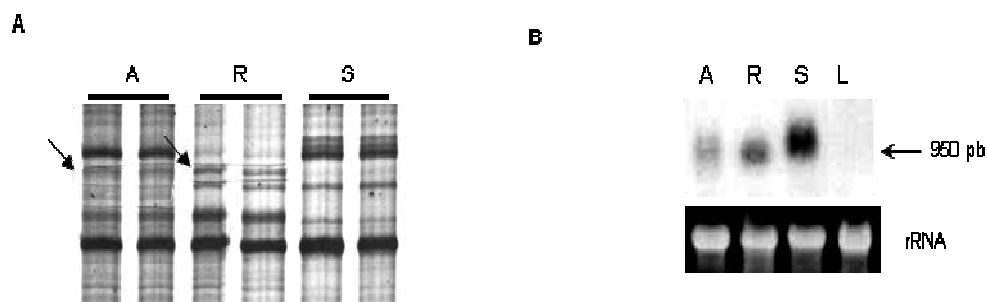


Figura 5. Identificação de um gene de milho, através da técnica *mRNA Differential Display*. A), cDNAs do ápice radicular (A), resto da raiz (R) e brotos (S) da linhagem Cat 100-6 foram aplicados em gel de seqüenciamento de DNA. A banda diferencialmente expressa está indicada pela seta. B) Acumulação do transcrito de um gene de milho em diferentes tecidos da planta. A hibridização do RNA total do ápice (A), raiz (R), broto (S) e folhas adultas (L) foi realizada com o fragmento isolado do display diferencial.

A pequena seqüência do inserto de DNA (130 pb) não permitiu identificar homólogos em bancos de dados. Assim, o cDNA completo foi clonado via RACE-PCR (*"Rapid Amplification of cDNA Ends"*), verificando-se que a proteína deduzida do cDNA completo apresentou alta identidade com proteínas de domínio LIM principalmente com a SF3, proteína específica de pólen de girassol (Figuras 5 e 6). Desta forma, o cDNA foi denominado *Zmlim-1*. A seqüência foi submetida ao *GeneBank* sob o número de acesso AF135591.1

```

      1 cctccgtaag cagagtttgt cgttggtgag gcaggaagag
          agacgacggc
      M   A   T   S   F   Q   G   T   T   T   K   R   T   A   C   (15)
51 ggccatggcg acctccttcc aggggacgac caccaagcgc accgcctgcg
   D   K   T   V   Y   L   V   D   K   L   T   A   D   N   R   I   Y   (32)
101 acaagacggg gtacctgtgt gacaagctca ccgccgacaa ccgcattctac
   H   K   A   C   F   R   C   H   H   C   K   G   T   L   K   L   A   (49)
151 cacaaggcct gcttcgctg ccaccaactgc aagggcaccc tcaagctcgc
   N   Y   N   S   F   E   G   V   L   Y   C   R   P   H   F   D   (65)
201 caactacaac tccttcgagg gactgctcta ctgcaggcct cacttcgacc
   Q   L   F   K   R   T   G   S   L   D   K   S   F   E   G   T   P   (82)
251 agctgttcaa gaggacaggg agcttgagca agagcttcga aggaactccg
   K   V   V   K   P   E   R   N   F   A   G   T   R   E   K   C   V   (99)
301 aaggttgcca agccagaaaag aaacgttggg aatgagaatg ctactaaagt
   G   C   S   K   T   V   G   N   E   N   A   T   K   V   S   S   (115)
351 ctcaagcggc ttgtctggca ccagagagaa atgtgttgga tgcagcaaga
   A   V   Y   P   T   E   R   V   T   V   N   N   T   M   Y   H   K   (132)
401 cagtctatcc aactgagagg gtcactgtta acaacactat gtaccacaag
   S   C   F   K   C   C   H   G   G   C   T   I   S   P   S   N   Y   (149)
451 agctgcttca agtgctgcca tggagggtgc accatcagcc cttctaacta
   I   A   H   E   G   K   L   Y   C   K   H   H   H   I   Q   L   (165)
501 cattgcgcac gagggaagc tgtactgcaa gcaccaccac atccagctga
   I   K   E   R   G   T   S   A   S   L   R   M   T   T   R   R   H   (182)
551 tcaaggaaaag gggaacttca gccagcttga gaatgaccac gagaagacat
   H   R   L   G   H   W   R   R   M   N   M   S   I   D   H   (197)
601 cacaggctgg gtcactggag gaggatgaac atgagtattg atcactgagc
651 acaaccacag atgaataatg aatcctcttg catttcctta gagcactatg
701 tatttctgtg gcgtgggtcg atttcagttt taccaatgga ggtcatgtgt
751 gttcagagaa caatgatatt gttgtcttgt atctgcattg aaacgttggt
801 atctttgagt cagatactct acctgggttc accattttca ttggtcagaa
851 gatgcctctg cacctacaag acagaactgt aagctcttgg tccatctttt
901 gtttaagatg atgtttggca aaaaaaaaaa

```

Figura 6. Sequência completa do cDNA e a proteína deduzida obtida por *mRNA Differential Display* e 5' RACE-PCR. A sequência encontrada no D.D está em azul. Os números a esquerda referem-se as bases nucleotídicas e os números a direita aos aminoácidos (aa). A proteína deduzida contém 197 aa e apresenta 2 domínios LIM (mostrados em vermelho).

O gene *Zmlim-1* codifica uma proteína de 197 aminoácidos que apresenta dois domínios LIM. Estes domínios ligam-se a íons de zinco e estão presentes em várias proteínas, exercendo diferentes funções. Baseado em sua estrutura, as proteínas de domínios LIM são caracterizadas por apresentarem uma pequena região N-terminal (9 a 10 resíduos), dois domínios LIM (52 resíduos) separados por uma região espaçadora (40 a 60 resíduos), e um domínio C-terminal (Eliasson et al., 2000) (Figura 7).

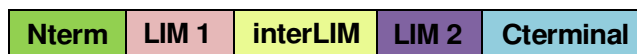


Figura 7. Representação esquemática de proteínas contendo domínio LIM em plantas. ZMLIM-1 basicamente contém uma região de domínio N-terminal (Nterm), dois domínios LIM (LIM1 e LIM2), uma região espaçadora (interLIM) e um domínio C-terminal (Cterminal).

Com a finalidade de verificar sua similaridade em outras espécies, realizou-se um alinhamento entre sequências similares à proteína ZMLIM-1 (Figura 8). A partir do alinhamento abaixo é possível verificar que os dois domínios LIM são altamente conservados entre as espécies, evidenciando que a principal diferença entre estas proteínas homólogas encontra-se na região inter domínio (região espaçadora interLIM) e na região C-terminal.

Estes resultados foram também verificados por Eliasson et al. (2000), que demonstraram que proteínas de domínio LIM homólogas pertencentes a diferentes espécies (girassol, arabis e fumo) apresentaram cerca de 50% de diferenças na região C-terminal e 30% na região espaçadora (InterLIM), enquanto diferenças menos significativas foram encontradas entre os dois domínios LIM e a região N-terminal.

NtPLIM1	--MTFAGTTQKCSACEKTVYLVDRLAADNRIYHKACFRCHCKSTLKLNSFNSFEGVIYC	58
NtWLIM1	--MAFAGTTQKCMACDKTAYLVDKLTADNRIYHKACFRCHCKGTLKLQNYNSFEGVLYC	58
CRP1	MATTFGGTQQKCMACDKTVYLVDKLTADNRVYHKACFRCHCKGTLKLQNYCSFEGVLYC	60
Lilim1	--MAFQGTQKCMACDKTVYLVDKLTADNRIYHKACFRCHCKGTLKLQNYNSFEGVLYC	58
Zmlim1	MATSFQGTQKCMACDKTVYLVDKLTADNRIYHKACFRCHCKGTLKLQNYNSFEGVLYC	60
SF3	MATSFQGTQKCMACDKTVYLVDKLTADNRIYHKACFRCHCKGTLKLQNYNSFEGVLYC	60
	: * * * * *	
NtPLIM1	RPHFDQLFKRTGSLDKSFEGTPKVKPEKPDNENGSGSKVSSLFAGTREKCVGCKTKTVY	118
NtWLIM1	RPHFDQLFKRTGSLDKSFEGTPKVKPEKPIDSGKPQVAKVTSMFGGTREKCFGCKTKTVY	118
CRP1	RPHFDQLFKRTGSLDKSFEGTPKVKPEKPIDSEN--ASKVSNKFAGTREKCVGCKTKTVY	118
Lilim1	RPHFDQLFKRTGSLDKSFEGTPKVKPEKPIDTEN--ANKVSGAFAGTREKCVGCKTKTVY	116
Zmlim1	RPHFDQLFKRTGSLDKSFEGTPKVKPEKPIDTEN--ATKVSSAFAGTREKCVGCKTKTVY	118
SF3	RPHFDQLFKRTGSLDKSFEGTPKVKPEKPIDTEN--ATKVSSAFAGTREKCVGCKTKTVY	118
	: ***:*****:***: :.. : ***: *.**.***.* **	
NtPLIM1	PIEKVSVNGTAYHKACFKCSHGGCTISPSNYIAHEGRLYCKHHHIQLFKEKGNYSQLESD	178
NtWLIM1	PTEKVSNGTPYHKSCFKCSHGGCVISPSNYIAHEGRLYCKHHHIQLIKEKGNLSKLEGD	178
CRP1	PIERVTVNGTPYHRSCKFKCTYGGCTISPSNYIAHEGRLYCKHHHIQLFKEKGNYSQLENE	178
Lilim1	PIERVTVNGTCYHKSCFKCAHGGCTISPSNYIAHEGRLYCKHHHIQLIKEKGNLSQLEGE	175
Zmlim1	PTERVTVNNTMYHKSCFKCCHGGCTISPSNYIAHEGRLYCKHHHIQLIKEKGNLSQLEND	178
SF3	PTERVTVNNTMYHKSCFKCCHGGCTISPSNYIAHEGRLYCKHHHIQLIKEKGNLSQLEND	178
	* *:***. * **:*** :***.***** *****:***. :.*.	
NtPLIM1	HE---TDPALSTQSLT---	191
NtWLIM1	HE---MNSTTTEVTAE-	193
CRP1	RQPATTEKITAVEIAAE-	196
Lilim1	-----TVAETA----	181
Zmlim1	TRRHRLGHWRMMSIDH	197
SF3	HEKTSQAGSLEDEQEY--	195

Figura 8. Alinhamento da proteína ZMLIM-1 com outras proteínas homólogas. ZMLIM1 (AF135591.1), NtPLIM1 (*Nicotiana tabacum*; AAD56950.1), NtWLIM1 (*N. tabacum*, AAD56948.1), Lilim1 (*Lilium longiflorum* ABY21316.1), CRP1 (proteína rica em cisteína de domínio LIM presente em animais XP002532425.1), SF3 (ACG33608.1) foram alinhadas com o software Clustal W. Aminoácidos isofuncionais que representam os domínios LIM aparecem em cinza.

Sabe-se que proteínas com domínios LIM estão envolvidas em uma ampla gama de funções como regulação da dinâmica do citoesqueleto, atividade transcricional, proteínas

ligantes de actina, etc. Como um dos principais problemas da cultura do milho envolve a toxidez por alumínio, a caracterização de genes envolvidos com funções de metabolismo celular, como a regulação da dinâmica do citoesqueleto podem auxiliar na compreensão dos mecanismos de tolerância e ou resistência aos efeitos tóxicos do Al na raiz. Até o momento, não existem relatos do envolvimento de proteínas com domínios LIM associadas a estresse, não sendo possível estabelecer uma função exata para *Zmlim-1* nas plantas de milho.

3.2 Caracterização do gene *Zmlim-1* em resposta ao estresse por alumínio

Com o objetivo de analisar a resposta do gene *Zmlim-1* ao estresse por alumínio, duas linhagens de milho contrastantes para a tolerância ao Al, Cat100-6 (tolerante) e S1587-17 (sensível) foram submetidas a doses crescentes de Al. É interessante salientar que a linhagem S1587-17 é uma linhagem isogênica e compartilha a mesma base genotípica de Cat100-6, já que foi obtida pela variação somaclonal de calos desta linhagem (Moon et al. 1997). Sementes destas duas linhagens de milho foram germinadas por 3 dias em BOD a 26°C e em seguida transferidas para solução simples de CaCl_2 0,1M contendo níveis crescentes de Al. Após 24 horas de estresse, ápices das raízes foram coletados por amostra e em seguida realizou-se a extração do RNA. A expressão do gene *Zmlim-1* foi avaliada via *northern blot* utilizando-se como sonda a região 3' não traduzida (3'UTR). A sonda 3'UTR foi obtida a partir da RT-PCR de cDNA de raízes de milho utilizando-se primers específicos para esta região. Esta sonda permite a amplificação de um produto de 300 pb e representa com maior especificidade a expressão do transcrito do *Zmlim-1*. Os resultados mostraram que a expressão do gene foi induzida em presença do alumínio apenas na linhagem de tolerante (Figuras 9 e 10). Além disso, é possível observar que o gene *Zmlim-1* tem sua indução aumentada na linhagem tolerante conforme as doses crescentes de atividade de Al, mantendo-se constante entre 5 a 50×10^{-6} , reduzindo sua expressão em 85×10^{-6} .

Em relação a linhagem sensível, praticamente não há indução do gene em nenhuma das condições testadas. O controle experimental (0) constituiu-se de ápices de milho mantidos em solução nutriente acidificada (pH 4).

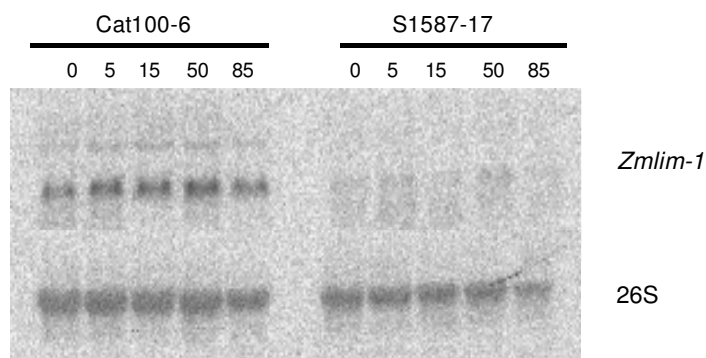


Figura 9. Expressão do gene *Zmlim-1* em ápices radiculares de plântulas expostas ao Al durante 24 horas. As plântulas Cat100-6 e S1587-17 foram mantidas em solução nutriente controle (0) ou contendo doses crescentes de Alumínio (5, 15, 50 e 85 $\times 10^{-6}$ medidos em atividade de Al)

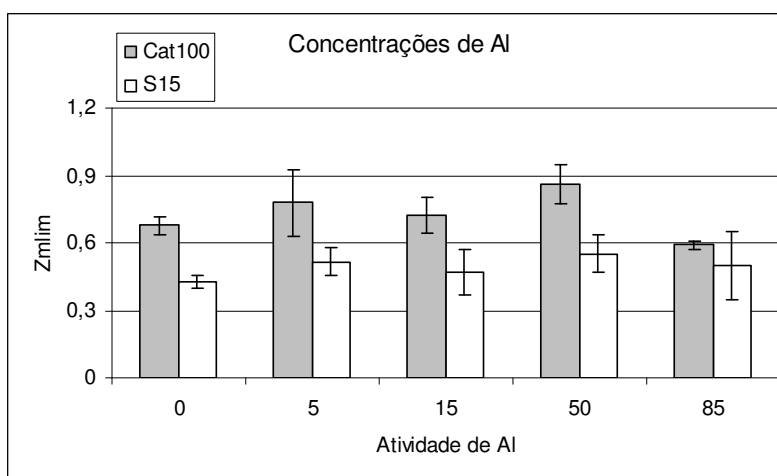


Figura 10. Quantificação do transcrito de *Zmlim-1* em ápices radiculares de plântulas expostas ao Al durante 24 horas. As plântulas Cat100-6 e S1587-17 foram mantidas em solução nutriente controle (0) ou contendo doses crescentes de Alumínio (5, 15, 50 e 85 $\times 10^{-6}$ medidos em atividade de Al)

3.3 Localização dos transcritos de *Zmlim-1*

A expressão detalhada do gene *Zmlim-1* no ápice radicular foi avaliada utilizando-se a sonda da região 3'UTR através da hibridização *in situ*. Observações microscópicas em cortes histológicos longitudinais de raízes revelaram que o gene *Zmlim-1* é expresso em praticamente todas as regiões da raiz. Na figura 11 é possível verificar que o transcrito de *Zmlim-1* acumula-se na maioria dos tipos celulares da ponta da raiz, como as da zona meristemática, onde os três

meristemas primários são encontrados: protoderme, que dá origem à epiderme, procâmbio, que produz xilema e floema, e o meristema fundamental, que produz o córtex (Figura 11A). *Zmlim-1* foi também expresso na região do procâmbio ao longo da raiz (Figura 11B), enquanto a coifa apresentou baixos níveis de mRNA (Figura 11C). A observação de que a expressão deste gene ocorre em regiões da raiz relacionadas a divisão, alongamento e diferenciação celular reforçam a idéia de que este gene poderia desempenhar um papel no funcionamento das várias partes da planta.

Os resultados aqui evidenciados contrastam com aqueles apresentados no *northern blot* (Figura 5B), onde a expressão do gene *Zmlim-1* apresentou-se maior no resto de raiz frente à comparação com o ápice. Este fato pode ter ocorrido em decorrência das células do resto da raiz serem mais vacuolarizadas sendo assim, a expressão do transcrito via *in situ* ficou menos evidente nesta região.

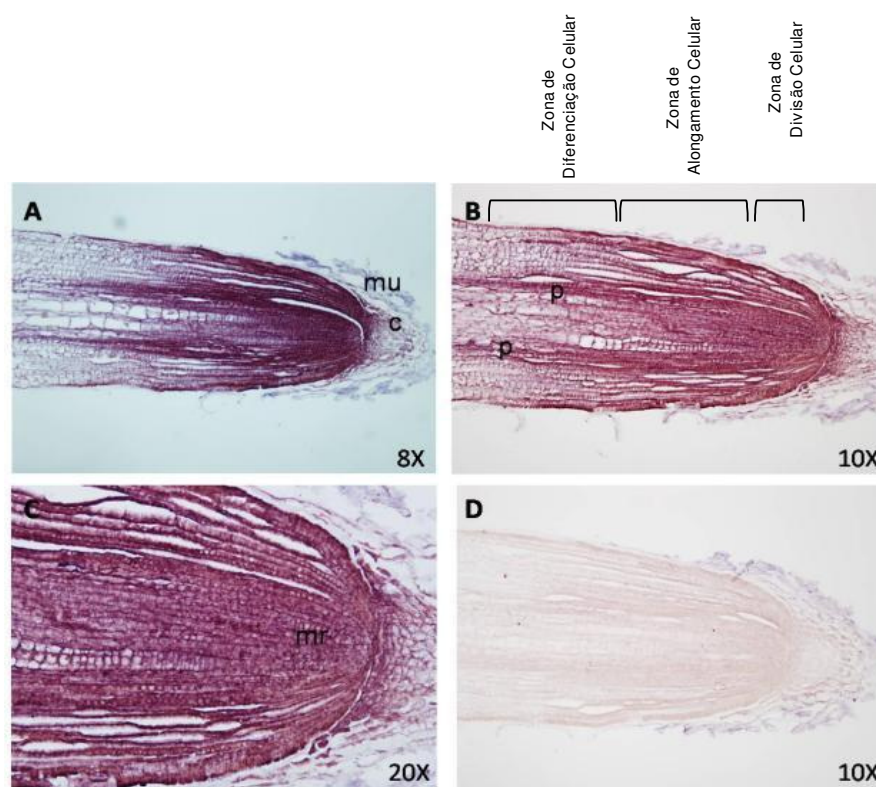


Figura 11. Localização *in situ* de mRNA do gene *Zmlim-1* em ápices de raiz de milho. Todas as seções são longitudinais. A-C) Cortes histológicos de raiz de milho, linhagem CAT 100-6 hibridizados com a sonda antisense, D) Controle negativo: CAT100-6 hibridizada com a sonda sense. O sinal de hibridação com a sonda 3'UTR do gene *Zmlim-1* pode ser observado como um precipitado roxo. c: coifa. mu: camada de mucilagem, mr: região meristemática, p: procâmbio.

3.4 Determinação da localização subcelular da proteína ZMLIM-1

A região codificante do gene *Zmlim-1* foi fusionada à proteína verde fluorescente (GFP, de *green fluorescent protein*) para investigar a localização subcelular da proteína ZMLIM-1. A construção p2GWF7::ZMLIM (e GFP) foi transformada transientemente testada em células de cebola (*Allium cepa*) empregando a técnica do bombardeamento de micropartículas. Os estudos de microscopia de fluorescência mostraram níveis de expressão elevada após 24 e 48 h do bombardeamento (Figura 12). As células exibiram coloração verde brilhante, principalmente no citoplasma e no núcleo (Figura 12B). Para avaliar a associação da proteína ZMLIM-1 com a membrana plasmática, uma solução de manitol (1M) foi adicionada visando plasmolizar as células. A partir da Figura 11D observa-se que a localização não foi associada à membrana plasmática, indicando que a proteína ZMLIM-1 foi localizada no citoplasma e no núcleo. Controles citoplasmático (35S::GFP) e nuclear foram bombardeados para validar os resultados (Figura 12E e 12F).

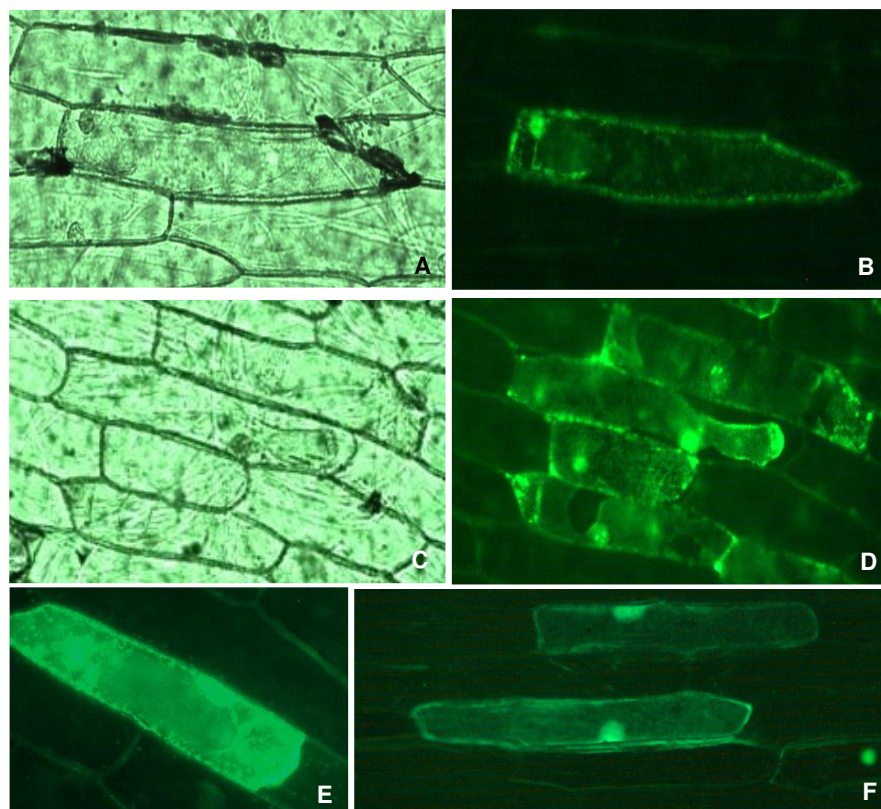


Figura 12. Localização subcelular da proteína ZMLIM-1. A região codificante do gene *Zmlim-1* foi fusionada a GFP utilizando o vetor de transformação de plantas p2GWF7 (Gateway System). Este cassete de expressão foi introduzido em células da cebola pela transformação via biobalística. A expressão transiente do gene *Zmlim-1* foi analisada após 24 horas. A) Branco; B) Expressão citoplasmática e nuclear do gene *Zmlim-1*; C) Célula após plasmólise em solução de manitol 1M (Branco); D) Confirmação da localização citoplasmática e nuclear após plasmólise, E) Controle citoplasmático (35S::GFP), F) Controle Nuclear (pRT104).

3.5 Interação de *Zmlim-1* com outras proteínas

Para aprofundar a análise da proteína ZMLIM-1, o sistema de duplo híbrido em leveduras foi empregado visando verificar a interação com outras proteínas de milho. Uma biblioteca de cDNA de ápices de raiz de milho exposta a 50×10^{-6} de atividade de alumínio foi construída por recombinação com o vetor pGADT7-Rec em levedura (cepa AH109). Cada clone teve seu DNA fusionado com o domínio de ativação a GAL4. Em seguida realizou-se o *mating type* das cepas, juntando a outra cepa Y187 transformada com a construção pGBKT7::*Zmlim-1*. As leveduras cresceram de acordo ao esperado e a formação de diploides foi observada após 20 h do *matyng type*. Passadas 24 h, as leveduras foram centrifugadas e plaqueadas em meio altamente seletivo (SD que não possui leucina, triptofano, adenina, nem histidina (-Leu, -Trp, -Ade, -His)), e o crescimento foi observado apos 3-5 dias. Das 250 colônias multiplicadas nesse meio de cultura, um total de 100 melhores foram selecionadas e isoladas para uma nova placa com o mesmo meio de cultura suplementado com X-alfa-Gal para verificar o terceiro gene repórter, onde as colônias ficam azuis. Das 100 melhores colônias selecionadas, 70 foram verdadeiramente positivas no ensaio de β -galactosidase. Essas 70 colônias foram reestriadas 3 vezes no mesmo meio de cultura para verificar a força da interação. A Figura 13 ilustra o crescimento de colônias positivas em meio altamente seletivo contendo X-alfa-Gal.

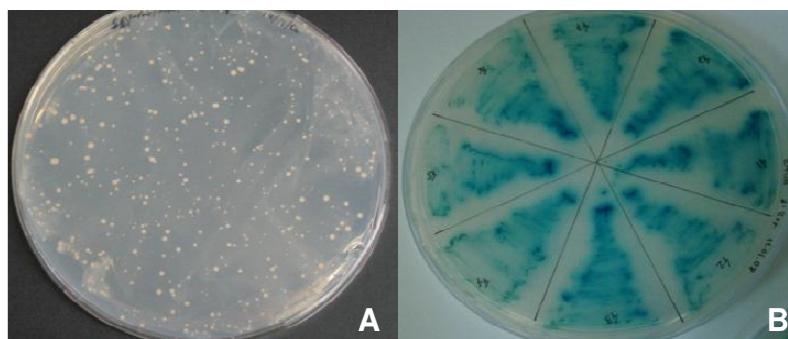


Figura 13. Ensaio de duplo-híbrido em levedura. A. Crescimento de células de levedura em meio seletivo resultantes do mating entre as cepas Y187 e AH109, contendo as construções expressando o gene *Zmlim-1* e a biblioteca de cDNA, respectivamente. B. Crescimento de células de levedura em meio seletivo contendo X-alfa-Gal (clones positivos).

A partir desses clones positivos, realizou-se a extração do DNA plasmidial de leveduras pelo método da liticase (Sherman et al., 1986). Em seguida, verificou-se a qualidade do DNA plasmidial de levedura em gel de agarose 1%, inseriu-se em *E.coli* pelo método do choque por eletroporação, e então, o plasmídeo contendo as possíveis interatoras foi isolado por seleção com o antibiotico específico do plasmídeo pGADT7. De posse do plasmídeo, realizamos a reação de PCR utilizando *primers* específicos que flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem desse vetor. Os produtos de PCR obtidos apresentaram tamanhos diferentes, demonstrando que possivelmente haveria mais de uma proteína interagindo com ZMLIM-1. Além disso, os plasmídeos foram digeridos com a enzima de restrição *Hind* III para análise do perfil de digestão desses produtos em gel de agarose. Dentre as 70 colônias positivas de levedura testadas, tivemos oito distintos perfis de digestão. Para determinar os possíveis ligantes de ZMLIM-1, esses plasmídeos foram seqüenciados utilizando os primers específicos do “*BD Matchmaker Library Construction and Screening Kit*” (Clontech, EUA). Utilizando o algoritmo BLAST (Altshul et al.) foi possível identificar estas potenciais seqüências. O resultado das análises de seqüências de alguns dos clones positivos é apresentado na Tabela 2. Curiosamente, foram identificados apenas três possíveis parceiros: uma proteína ribossomal da subunidade 60S (L31), uma proteína ribossomal da subunidade 40S (S21), e a proteína OMT-ZRP4, envolvida no metabolismo de fenilpropanóides e biossíntese de lignina. As outras colônias resultaram em prováveis clones falsos positivos, como fragmentos do vetor de duplo híbrido ou peptídeo, que é um problema comum nesse tipo de ensaio. Esses três possíveis parceiros foram encontrados no seqüenciamento de colônias diferentes reforçando ainda mais a possibilidade das interações serem verdadeiras.

Tabela 2. Ensaio de duplo híbrido em leveduras.

Biblioteca utilizada	cDNA ápice de milho induzido por Al
Isca utilizada	<i>Zmlim-1</i>
Número de clones positivos para os três repórteres	70
Número de clones analisados	70
Sequências identificadas	ZRP4-OMT (4 clones diferentes) proteína ribossomal L31 (4 clones) proteína ribossomal S21 (6 clones)

3.6 Transformação genética de calos de milho com o gene *Zmlim-1*

3.6.1 Obtenção e seleção das plantas transformadas

Nos experimentos iniciais, calos de milho da linhagem A188 foram bombardeados através da co-transformação com as construções pUBILIM (pUBI::Zmlim::NOS) e pAHC20 (pUBI::Bar::NOS), a fim de obtermos plantas transgênicas superexpressando o gene *Zmlim-1*. Em todos os bombardeamentos utilizou-se um controle com GUS bombardeando epitélio de cebola, para avaliar o sucesso no preparo das partículas e condições de bombardeio.

Os calos bombardeados foram mantidos em meio de cultura suplementado com 2 mg/L de 2,4-D com doses crescentes do agente seletivo PPT (fosfinotricina), e após cerca de 2 meses de subcultivos quinzenais foram colocados em meio de cultura para maturação. No entanto, os calos demoraram cerca de 1 mês para maturar e após a maturação, quando foram colocados em meio de cultura MS em presença de luz, a maioria dos calos maturados não desenvolveu plântulas e apresentou uma leve oxidação. Apesar de conseguirmos atingir a maturação de apenas 2 calos embriogênicos putativamente transformados, estes calos não se diferenciaram em plântulas após 2 meses em meio de cultura.

Com esta dificuldade na obtenção de plantas transgênicas de A188, e a pouca formação de calos embriogênicos, optamos pela troca da linhagem A188 por HiII. O híbrido HiII é

proveniente do cruzamento de A188 x B73 e caracteriza-se como um material extremamente embriogênico, desenvolvendo-se bem em cultura de tecidos, com a obtenção de calos friáveis do tipo II, facilitando a obtenção de plantas geneticamente transformadas. Sendo assim, os calos de HiII foram bombardeados com as construções pUBI::*Zmlim1*::NOS e pUBI::*Bar*::NOS. Após a manutenção dos calos nas diferentes etapas do processo de cultura de tecidos (Figura 14) foi possível obter sete plantas potencialmente transgênicas, sendo que estas provavelmente correspondem a 6 eventos, visto que duas plantas foram provenientes da maturação do mesmo calo.

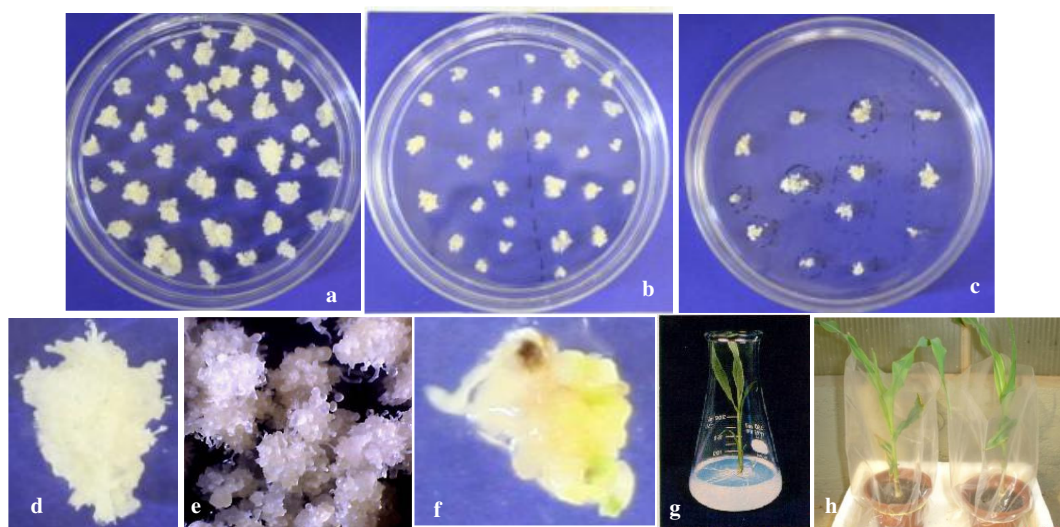


Figura 14. Transformação genética de milho a partir de calos embriogênicos com a construção pUBILIM em cotransformação com o vetor pAHC20. A) Calos embriogênicos selvagem (linhagem Hi-II); B) Calos embriogênicos transformados em meio de cultura de seleção (PPT); C) Calos embriogênicos em maturação; D) Calo embriogênico (Hi-II) em detalhe E) Calo embriogênico selvagem em detalhe; F) Calo maturado no início de regeneração; G) Desenvolvimento inicial da plântula transformada linhagem HiII, H) Aclimação das plântulas.

As plantas obtidas, constituindo-se a geração T0, foram aclimatadas em vasos com 250 g de uma mistura de terra:vermiculita:esterco (1:1:0,1 p/p) e fechadas com saco plástico mantendo-as em BOD a 27°C durante as 2 semanas iniciais. Em seguida, foram mantidas em casa de vegetação até o final do seu ciclo de desenvolvimento (Figura 13h). Para verificar se as plantas eram transgênicas, aplicou-se o agente seletivo, glufosinato de amônio (PPT) com um pincel nas folhas aos 25 dias após a aclimação (Figura 15).

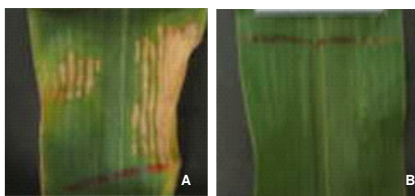


Figura 15. Efeito da aplicação de ppt em folhas de plantas de milho. A) Controle Selvagem mostrando sintomas do ppt, B) Planta transgênica resistente ao PPT.

Nesta fase de aclimatização duas plantas morreram a causa de contaminação por fungo, restando assim quatro plantas. Inicialmente, para verificação da inserção do transgene aplicou-se PPT, verificando-se que as quatro plantas obtidas apresentaram resistência, sendo portanto transgênicas para o gene de seleção. No entanto, o processo utilizado para obtenção destas plantas foi a co-transformação, o que poderia ter acarretado a inserção de apenas um dos genes, o gene de seleção ou o gene de interesse. Sendo assim, após a confirmação pelo teste de resistência, o DNA das plantas foi extraído pelo método CTAB e foi realizada uma reação de PCR utilizando a combinação primer específico do gene *Zmlim1* e primer do intron da ubiquitina, já que o gene *Zmlim-1* é endógeno e não permitiria a identificação das plantas transgênicas.

A Figura 16 indica a região de anelamento dos primers Intron (5"GATATCATGACAGGAAAAAAGCTAAT3") e *Zmlim1_STOP* (5"**GGTACCT**CAGTGATCAATACTCATGTTTCATCCT3"), que amplificam um produto de 800 pb. O resultado da reação de PCR em plantas transgênicas de milho a partir destes óligos é apresentado na Figura 17.

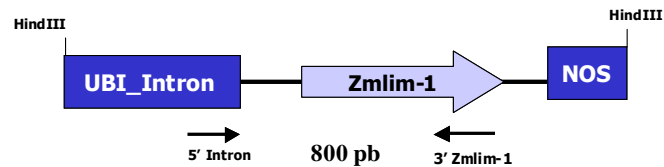


Figura 16. Representação esquemática do cassete de expressão pUBI::Zmlim1::NOS. Os primers 5"Ubi_Intron (→) e Zmlim1_STOP (←) amplificam um fragmento de 800pb nas plantas transgênicas.

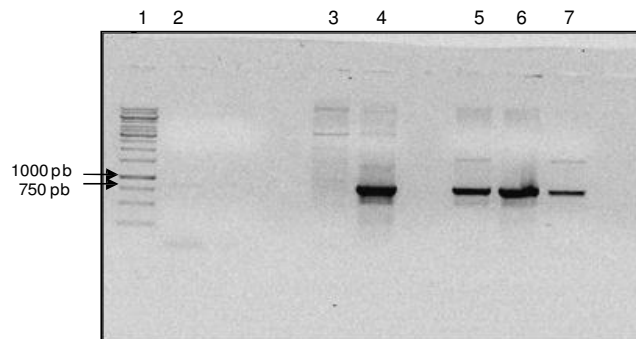


Figura 17. Resultados da análise de PCR com plantas transgênicas e selvagem com os primers 5"Ubi_Intron e Zmlim1_STOP. Poço 1: Marcador de peso molecular 1kb (Fermentas); 2 e 3: controles negativos; água e planta selvagem, respectivamente; 4: controle positivo: plasmídeo pUBILIM; 5 - 7: plantas transgênicas de 1 a 3, respectivamente.

Para testar a inserção simultânea do gene *Bar* e *Zmlim1* via PCR, utilizamos os primers **UBI_intron** (5"CATCTATTCATATGCTCTAACCTTG3") e **NOS_antisense** (5"CCCGATCTAGTAACATAGATGGAC 3"), os quais foram desenhados a partir da região intron do promotor da ubiquitina e da região terminadora NOS, presentes no cassete de expressão tanto da construção contendo o gene *Bar* (vetor pAHC20) como também no vetor pUBI::*Zmlim1*::NOS. A figura 18 indica o tamanho em pares de bases da região entre o anelamento destes dois oligonucleotídeos.

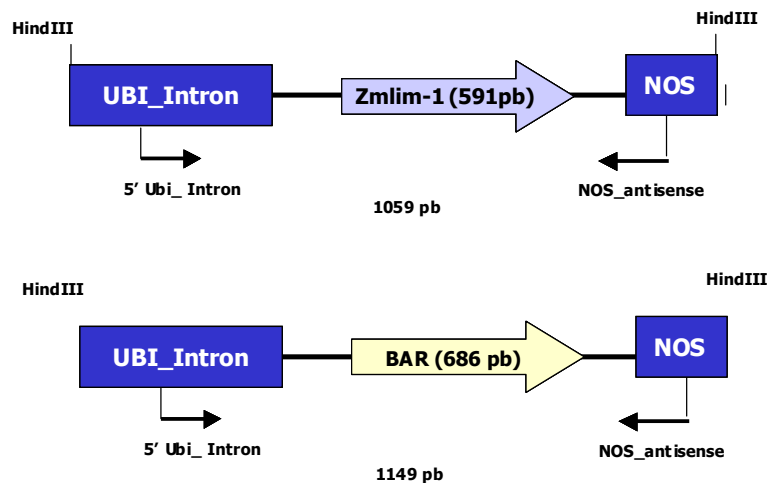


Figura 18. Representação esquemática dos cassetes de expressão pUBI::ZMLIM1::NOS e pAHC20. Os primers UBI_intron (→) e NOS_antisense (←) amplificam um fragmento de 1059pb no cassete pUBI::Zmlim1::NOS (foto superior) e de 1149 pb no cassete pAHC20 (foto inferior).

Para verificar se os dois genes estavam presentes nas plantas transgênicas de milho, realizou-se por PCR a partir da combinação dos óligos acima. A visualização de dois fragmentos, correspondentes aos tamanhos de aproximadamente 1059 pb (*Zmlim-1*) e 1149 (*Bar*) foi observada nas plantas transgênicas 1, 2 e 3 (Figura 19). Assim, dentre as quatro plantas co-transformadas ocorreu a inserção dos dois genes em três delas.

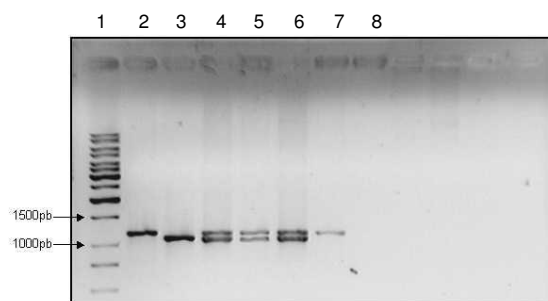


Figura 19. Análise da integração dos dois transgenes. 1: Marcador de peso molecular 1kb (Fermentas); 2 e 3: controles positivos pAHC20 e pUBI::*Zmlim1*::NOS, respectivamente; 4 - 7: plantas transgênicas de 1 a 4, respectivamente

3.6.2 Caracterização das plantas transgênicas por *Southern blot*

Com a finalidade de verificarmos o número de inserções do transgene nas plantas, realizamos a análise de *Southern blot*. O DNA genômico de 4 plantas transgênicas da geração T0 foi extraído pelo método CTAB (Doyle e Doyle, 1987). Três destas plantas apresentaram a integração dos dois transgenes (gene de seleção e gene de interesse). A planta 4 apresentada na Figura 19, desenvolveu-se a partir do mesmo calo maturado da planta 3, sendo assim, possivelmente revelará o mesmo padrão de integração. Um DNA da planta selvagem HiII foi usado como controle negativo e para o controle positivo utilizou-se o plasmídeo pUBILIM linearizado com *PstI*. Escolhemos a enzima *PstI* para digerir o DNA genômico, visto que ela corta em apenas um sítio no vetor do gene de interesse (pUBi::*Zmlim-1*::NOS), permitindo estimar o número de inserções presentes nas plantas. Inicialmente utilizou-se a região codificante do gene *Zmlim-1* e uma pequena parte da região do intron da ubiquitina. Esta região caracteriza-se por ser uma sonda endógena e que certamente revelaria também a presença do gene *Zmlim-1*/Intron endógeno nas plantas. Optou-se por esta sonda, visto que no caso das plantas transgênicas possivelmente encontraríamos um resultado diferente para a introdução deste gene (com maior número de bandas). A hibridização da sonda preparada a partir da amplificação da sequência do gene *Zmlim-1* (primer Rv) e *Intron* (primer Fw), com um produto de 800 pb, em fragmentos de DNA de diferentes tamanhos permitiu verificar a independência de cada evento de transformação, assim como o número de inserções do transgene no genoma da planta. Pela análise de *Southern blot* das amostras digeridas com *PstI* (Figura 20) observa-se a presença de 6 bandas na linhagem selvagem, que hibridizou com a sonda endógena codificante, enquanto que todas as linhagens transgênicas da geração T0 apresentaram além destas bandas cerca de 4 a 6 bandas a mais, confirmando assim a integração do transgene no genoma dessas plantas (Figura 20B).

A fim de validar a quantidade de bandas integradas no genoma das plantas a membrana foi estripada para nova hibridação com uma segunda sonda. A estripagem da membrana constitui-se da remoção da sonda, através da lavagem da membrana com solução de SDS 0,5% a 60°C por 1 hora e seu subsequente enxague em solução de Tris Base 100 mM pH 8,0 por 5 minutos a Temperatura ambiente. Em seguida, utilizou-se a membrana novamente re-hibridizando-a com a sonda NOS. A partir dos resultados (Figura 20C) é possível verificar que cerca de 6 cópias do transgene foram inseridas nas plantas transgênicas. O controle negativo apresentou 2 bandas inespecíficas provavelmente resultantes da dificuldade em remover toda a sonda anterior pela lavagem em SDS.

Pelo presente, é possível verificar que as plantas 1, 2 e 3 são eventos independentes dada a integração em posições diferentes e a 4, como esperado apresenta o mesmo perfil que a planta 3 sendo clones idênticos, já que a partir do mesmo calo foi possível verificar a formação de 2 plantas. Neste caso, a planta 4 aqui apresentada não é a mesma evidenciada na Figura 19.

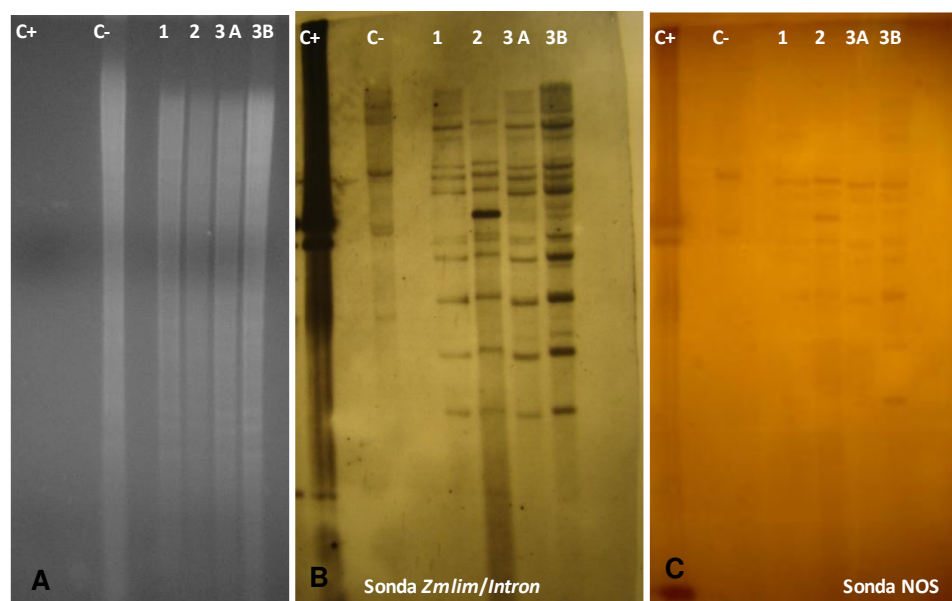


Figura 20. Southern blot do DNA genômico das plantas transgênicas geração T0. C⁺: plasmídeo linearizado com *PSTI*, C⁻ planta selvagem HiII, 1 a 4 eventos T0, sendo que 3 e 4 são clones plantas provenientes do mesmo calo e correspondem a um único evento. A) Padrão da Digestão das amostras, B) Membrana hibridizada com a sonda Zmlim/Intron, C) Hibridização com a sonda NOS.

Todas as plantas transgênicas apresentaram macho-esterilidade (Figura 21) sendo necessário o cruzamento com seu selvagem HiII ou com a própria linhagem A188 ou B73. Como nosso controle selvagem também apresentou macho esterilidade a polinização das plantas foi realizada na EMBRAPA Milho e Sorgo (Sete Lagoas, MG) com o parental B73, permitindo assim a recuperação de eventos transformados na geração T1.



Figura 21. Sequência da transformação genética de milho via biobalística. A) Plantas transgênicas HiII (T0), B -C) Controle Selvagem e Planta Transgênica exibindo macho esterilidade; D) Cruzamento das plantas transgênicas (Geração T1: HiII vs B73)

O evento 1 produziu 25 sementes, e devido ao baixo número de segregantes não foi submetido ao estresse por Al em solução hidropônica. Aplicou-se o ppt em todas as plantas para verificar a proporção dos segregantes e em seguida, a análise de PCR foi realizada, constatando que 6 de 25 plantas apresentaram a integração do transgene.

O evento 2 produziu 55 sementes que foram germinadas e usadas nos ensaios fisiológicos para tolerância ao Al³⁺. Entre as 55 sementes germinadas, 19 foram positivas, amplificando o produto desejado por PCR. No ensaio hidropônico foram usadas como controle experimental as duas variedades contrastantes ao Al, Cat 100-6 (tolerante) e S1587-17 (sensível), a variedade

HiII (moderada). Devido ao ensaio ter sido conduzido com plantas da geração T1 a avaliação do evento 2 foi realizada também com as plantas azigóticas (PCR negativas) provenientes do cruzamento do evento 2 HiII transformado vs B73. O evento 3 não foi avaliado.

3.6.3 Avaliação fenotípica de plantas que superexpressam o gene *Zmlim-1*

Ensaio Hidropônico

Sementes de milho de Cat 100-6, S1587-17, evento 2 (HiII vs B73) transgênico e HiII selvagem foram inicialmente desinfestadas com hipoclorito de sódio 2% e lavadas cinco vezes com água destilada, sendo em seguida colocadas para pré-germinar em papel de germinação. Estas sementes foram incubadas em BOD durante 3 dias em temperatura de 27°C e fotoperíodo de 16 horas luz. Após este período as plântulas foram transferidas para a solução de CaCl₂ pH 4,0 sem Al³⁺ onde permaneceram por 24 horas, o qual correspondeu ao período de estabilização. Completadas as 24 horas foi feita uma medição do comprimento das raízes de todas as plântulas e em seguida as mesmas foram expostas a solução de CaCl₂ pH 4,0 com 17 10⁻⁶ de atividades livre de Al³⁺. As medições subseqüentes foram realizadas após 24 horas de exposição a esta solução.

Este ensaio permitiu avaliar o potencial de tolerância conferido pelo gene *Zmlim1* nas plantas transformadas em comparação com as selvagens (não transformadas). As plantas transformadas apresentaram crescimento radicular relativo semelhante ao controle não transformado após 24 horas de exposição ao Al, sendo assim o gene *Zmlim-1* não possibilitou aumento na tolerância a este íon (Figura 22). O controle experimental neste caso, constituiu-se de plantas azigóticas que apresentaram-se PCR negativas (evento controle). Este experimento foi conduzido com 55 sementes produzidas a partir do cruzamento de planta T0 do Evento Matriz 2 cruzada com a linhagem B73. Após o ensaio hidropônico foi realizada análise da presença do transgene *Zmlim-1* e apenas 19 foram positivas segundo dados de PCR de DNA genômico

(dados não mostrados). Somente essas 19 sementes foram consideradas para os cálculos de crescimento radicular. Na figura 22 também é possível verificar que a linhagem Cat100-6 apresentou maior tolerância frente à exposição ao Al em relação à linhagem S1587-17. Este é o resultado esperado para essas duas linhagens e evidencia que as condições experimentais foram adequadas.

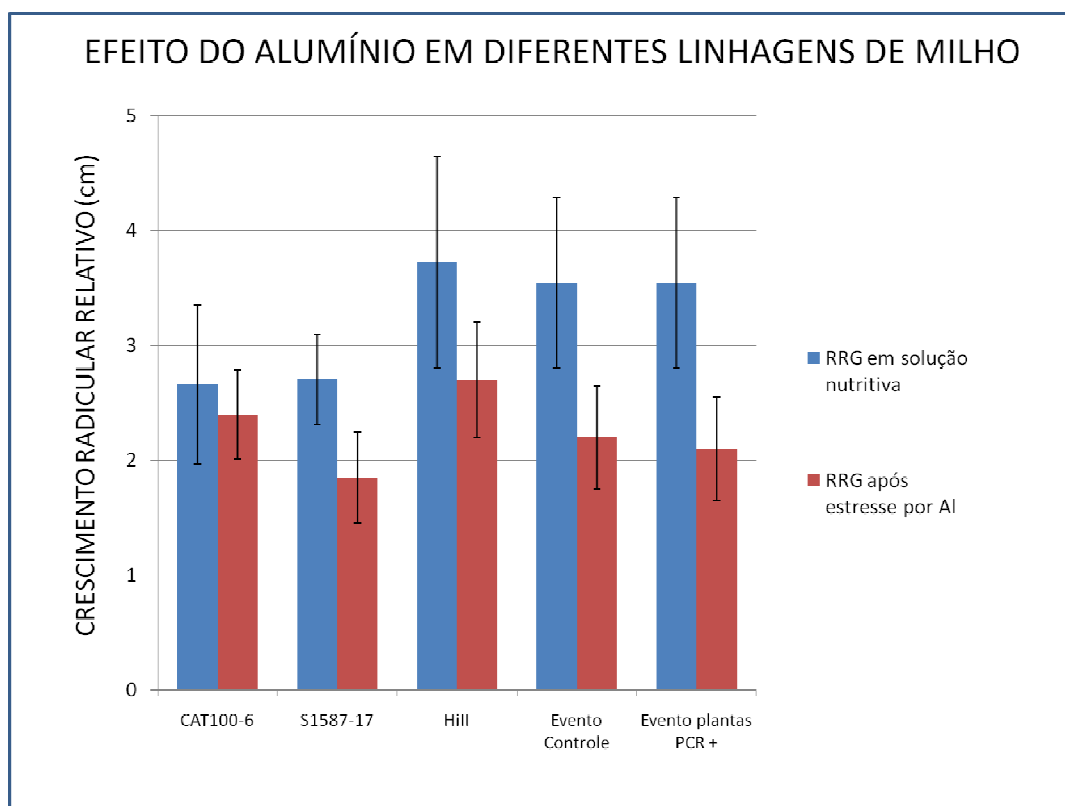


Figura 22. Efeito do alumínio em diferentes linhagens de milho. As medidas representam a diferença de crescimento entre o controle (sementes mantidas em solução ácida) e após estresse por Al. RRG: crescimento radicular relativo.

Esta análise foi realizada com um número reduzido de sementes, devido o baixo número de segregantes obtidos. Sendo assim, não é possível concluir a relação do gene *Zmlim-1* e seu papel na tolerância ao Al. O ensaio experimental precisa ser conduzido com maior espaço amostral. Maiores esforços devem ser realizados visando entender o potencial deste gene frente à tolerância ao Al.

3.6.4 Avaliação do padrão de expressão do transcrito de *Zmlim-1*

Em vista do resultado negativo no ensaio anterior, foi verificado o padrão de expressão do transcrito do gene *Zmlim-1* nas plantas transgênicas. Para tanto, realizou-se uma qRT-PCR a partir do cDNA de folhas de milho transgênicas de 4 plantas transformadas. Estas plantas referem-se às avaliadas com relação a tolerância ao alumínio. A partir da Figura 23, é possível verificar que três plantas reduziram significativamente a expressão do transcrito gene *Zmlim-1*, e apenas uma apresentou aumento. Esta redução no padrão de expressão do gene *Zmlim-1* possivelmente ocorreu devido ao alto número de cópias integrado no genoma das plantas. Neste ensaio, apenas a planta T1 2 superexpressou o gene. Este resultado pode explicar o motivo pelo qual as plantas transgênicas obtidas não conferiram a esperada tolerância (Figura 21), uma vez que a maioria dos eventos avaliados apresentou silenciamento do gene endógeno.

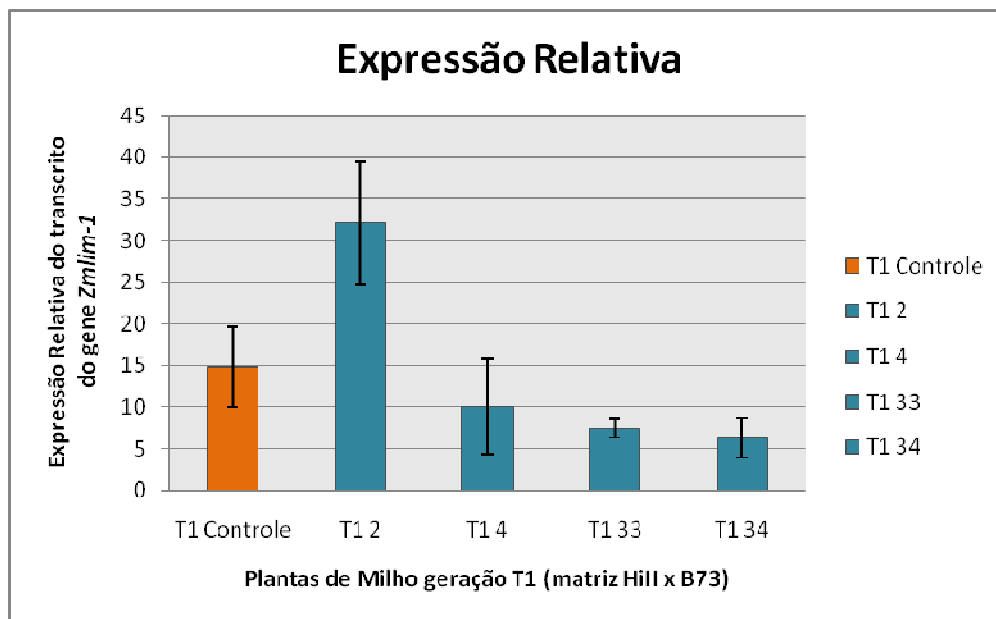


Figura 23. Expressão relativa do transcrito do gene *Zmlim-1* em plantas transgênicas de milho (o ensaio foi conduzido em triplicata, T1 Controle (controle selvagem HiII x B73), T1 2 a T1 34 plantas transgênicas avaliadas com relação ao conteúdo de lignina).

3.6.5 Avaliação do conteúdo de lignina nas plantas transgênicas

Existem diversos relatos associados ao envolvimento de proteínas LIM de plantas com a biossíntese de lignina (Kawaoka et al., 2000, Kawaoka et al., 2006). Ao verificarmos pelo ensaio de duplo híbrido que ZMLIM-1 interagiu com a proteína ZRP4-OMT, decidimos verificar se as plantas transgênicas superexpressando o gene *Zmlim-1* poderiam estar envolvidas com a biossíntese de lignina.

Um método de coloração histoquímica utilizando fluoroglucionol-HCl (Dean 1997), comumente utilizado para estimar o teor de lignina foi usado para corar a fresco seções retiradas da região média da raiz. No ensaio com fluoroglucionol-HCl foi possível verificar que a epiderme e o tecido vascular de plantas transgênicas apresentaram coloração menos intensa do que as plantas controle indicando que o teor de lignina foi reduzido em plantas superexpressando o gene *Zmlim-1* (Figura 24).

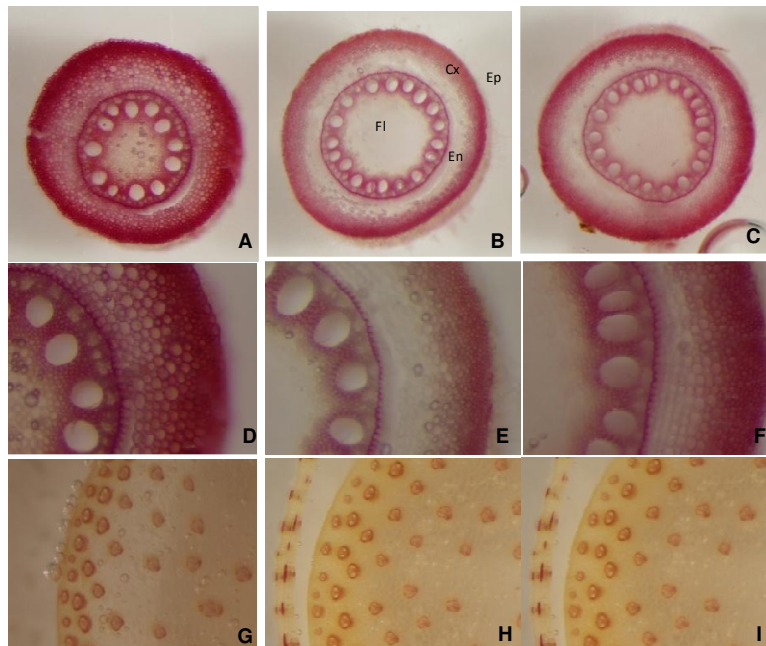


Figura 24. Coloração de tecidos de milho através do fluoroglucionol. Cortes de raízes planta selvagem (A, D) e de caule planta selvagem (G); cortes de raízes (B, E) e do caule (H) da planta 4, geração T1; cortes de raízes (C, F) e do caule (I) da planta 33.

A partir deste resultado evidenciando redução no conteúdo de lignina nas plantas, amostras de folhas adultas foram coletadas e quantificadas quanto ao conteúdo de lignina, através do método proposto por Van Soest e Wine, (1968). Uma redução substancial (30-40%) no teor de lignina total foi observada nas folhas das plantas que superexpressaram o gene *Zmlim-1* (Tabela 3).

Tabela 3. Quantificação de lignina em planta selvagem e transgênicas superexpressando *Zmlim-1*. A análise foi feita com duas repetições

Amostras	%FDA	% Lignina
HiII vs Par.B73	32,71± 0,2	3,54 ± 0,17
T1 - planta 2	31,2 ± 0,57	3,2 ± 0,2
T1 - planta 4	29,51 ± 1,02	2,11±0,14
T1 - planta 33	31,96± 0,33	2,04 ± 0,1
T1 - planta 34	29,61 ± 0,55	1,84 0,1

Outro resultado interessante da análise histológica é a observação de que todas as plantas transgênicas apresentaram alterações na anatomia da raiz (Figura 23). Isto indica que a proteína ZMLIM-1 também atua na definição de características anatômicas da raiz de milho.

Considerando que a maioria das plantas transgênicas suprimiu o gene *Zmlim-1*, as alterações anatômicas observadas nas raízes de plantas transgênicas sugerem que a proteína ZMLIM-1 pode desempenhar uma variedade de funções nas células de milho

4 DISCUSSÃO

4.1 Identificação e isolamento do gene *Zmlim-1* de milho

O alumínio é um dos metais mais abundantes no solo. Em solos ácidos, que cobrem grandes áreas ao redor do globo, a forma rizotóxica do Al (Al^{3+}), está solúvel e atua principalmente no ápice da raiz, inibindo o desenvolvimento da planta. Diversas hipóteses têm sido propostas para explicar os mecanismos de tolerância e resistência das plantas. Basicamente, estes mecanismos são subdivididos em duas classes principais: mecanismos externos (exclusão), e mecanismos internos (tolerância ao Al) que conferem a capacidade das plantas de tolerar a Al no simplasto. Baseado nesta premissa, a descoberta de genes induzidos pelo estresse por Al pode ser considerada uma ferramenta importante no entendimento das bases moleculares e fisiológicas envolvidas na complexidade da tolerância ao alumínio.

Visando identificar um cDNA de milho específico de raiz, a técnica de *mRNA differential display* foi utilizada (Figura 5) permitindo-nos identificar um gene diferencialmente expresso em ápice e raiz, e não expresso em folhas adultas. A partir dos resultados de seqüenciamento, verificou-se que a proteína deduzida do cDNA completo contém 197 aa e apresenta 2 domínios LIM (Figura 6). Desta forma, o cDNA foi denominado *Zmlim-1*.

O gene *Zmlim-1* foi expresso abundantemente nas raízes, ápice e brotos, mas não apresentou expressão em folhas adultas (Figura 5B) podendo estar associado a diversas funções celulares. É oportuno salientar, que em tabaco e, possivelmente, em todas as outras plantas parece haver duas isoformas de proteínas contendo domínios LIM, caracterizando-se basicamente pela expressão tecido específica, neste caso, expressando-se especificamente no pólen (PLIM-1, Eliasson et al., 2000) ou tecido não específica, ou seja, ocorrendo constitutivamente em vários órgãos vegetativos e reprodutivos (WLIM-1, Eliasson et al., 2000).

Estes domínios estão presentes em diversas proteínas e tem várias funções no metabolismo celular. Na maioria das plantas existem dois domínios LIM muito semelhantes

separados por cerca de 50 aminoácidos (região interLIM) e um domínio C-terminal relativamente pequeno e variável (Figura 7).

Em plantas, as proteínas LIM foram descritas em girassol, arabidopsis, fumo e eucalipto (Baltz et al., 1992; Mundel et al., 2000; Kawaoka et al., 2000; 2006). A proteína deduzida ZMLIM-1 apresentou alta similaridade com proteínas de domínio LIM principalmente com a SF3, proteína específica de pólen de girassol (Figura 8). A proteína SF3, foi a primeira proteína contendo domínios LIM caracterizada em plantas (Baltz et al., 1992 a,b) caracterizando-se por apresentar atividade transcricional e ligar-se a DNA *in vitro*. Esta proteína, renomeada HaPLIM-1 foi detectada nos cones de germinação de grãos de pólen maduros uma região enriquecida com actina (Baltz et al., 1999).

Sua associação com estresse causado pelo alumínio nunca foi estudada. Portanto, ainda não há evidências que sugerem que qualquer domínio LIM poderia estar associado com o alumínio. Nossos resultados mostram que o gene *Zmlim-1* foi induzido somente na presença de Al na linhagem tolerante (Figura 9).

Após exposição ao Al, as células da coifa e do meristema tornam-se vacuoladas e mostram seqüencialmente: perda da função do complexo de Golgi, ausência de desenvolvimento dos plastídeos, alterações na estrutura nuclear, perda de citoplasma, e finalmente desintegração (Taylor, 1988). As regiões meristemáticas da raiz principal e das raízes laterais tornam-se desorganizadas, a ponto de não ser possível distinguir as células da coifa, do meristema e dos tecidos vasculares. Além disso, os sítios de erupção das raízes laterais não conseguem se desenvolver normalmente (Rao et al., 1993; Taylor, 1988).

A toxidez do Al compreende efeitos de curta duração (mensuráveis após minutos de exposição ao íon), e efeitos de longa duração, que são medidos após horas, até mesmo dias de exposição. Tais efeitos tardios não são necessariamente causados diretamente pelo Al. Pelo contrário, em sua maioria são conseqüências da alteração de diversos processos bioquímicos e

fisiológicos afetados pelo Al. No entanto, de um modo geral é muito difícil diferenciar respostas iniciais relacionadas à inibição do crescimento radicular de respostas secundárias, conseqüentes dos danos iniciais gerados pelo Al. Apesar de os dois aspectos da toxidez do Al influenciarem o crescimento das plantas em solos ácidos, essa confusão tem dificultado a determinação do mecanismo (ou mecanismos) primário pelo qual o Al exerce seus efeitos tóxicos (Rengel, 1992).

Essa grande diversidade de vias metabólicas afetadas pelo Al e sua complexidade evidencia o grande número de genes que podem estar envolvidos na resistência ao íon. A identificação e avaliação desses genes contribuirão para o desenvolvimento de plantas resistentes.

4.2 Caracterização molecular do gene *Zmlim-1*

A hibridização *in situ* (Figura 11) demonstrou que o transcrito de *Zmlim-1* acumula-se na maioria dos tipos celulares da ponta da raiz, como as da zona meristemática, onde os três meristemas primários são encontrados, sendo que na coifa, observou-se baixa expressão, reforçando a idéia de que este gene poderia desempenhar um papel no funcionamento das várias partes da planta.

Nos últimos anos, o conhecimento sobre a organização funcional e morfológica do ápice radicular cresceu substancialmente. Baseados em características morfológicas, citológicas e fisiológicas, Ishikawa e Evans (1995) e Baluška *et al.* (1996) classificaram zonas no ápice radicular de milho numa escala milimétrica: 0 a 1.7 mm, zona meristemática; 1.7 a 3.4 mm, zona de elongação distal (ou de transição); 3.4 a 3.9 mm, zona de elongação apical; 3.9 a 5.6 mm, zona de elongação central; > 5.6 mm, zona de elongação. Sivaguru e Horst (1998) demonstraram que se cada uma das 3 primeiras zonas apicais da raiz for exposta ao Al individualmente, ocorre inibição do crescimento radicular em milho. Esses autores observaram que a porção distal da zona de transição (1,7 a 3,4 mm do ápice radicular) é a parte da raiz mais sensível ao alumínio.

Kollmeier et al. (2000) identificaram a porção distal da zona de transição (DTZ) da raiz de milho, que contém células recém divididas mas que ainda não se alongaram, são as mais sensíveis ao Al. Através dos resultados da hibridização *in situ*, foi possível verificar que o transcrito do *Zmlim-1* apresenta-se nas 3 zonas apicais da raiz, indicando que este gene poderia estar envolvido com a tolerância ao Al.

Em relação ao direcionamento da proteína, semelhantemente às CRPs, proteínas LIM têm sido identificadas exibindo dupla localização subcelular, acumulando-se no núcleo e no citoplasma onde ocorre a interação com o citoesqueleto. O direcionamento da proteína ZMLIM-1 foi observado em epitélios de cebola bombardeados com a construção fusionada à proteína GFP. Em concordância com os dados apresentados para as outras proteínas LIM (Eliasson et al., 2000; Kawaoka et al., 2000; Thomas et al., 2006). a expressão transiente de ZMLIM-1 revelou que esta proteína está localizada no citoplasma e no núcleo.

Proteínas contendo domínios LIM em plantas (girassol, tabaco e arabidopsis) apresentam-se direcionadas para o citoplasma, como um componente de complexos moleculares que podem interagir com os microtúbulos, e para o núcleo, como um parceiro de fatores de transcrição durante a intérfase (Brière et al., 2003). Em protoplastos, HaWLIM-1 parece estar associada aos microtúbulos na região cortical e ao núcleo durante a intérfase. Recentemente, Thomas et al. (2006), verificaram que em semelhança às CRPs, a proteína NtWLIM-1 liga-se a F-actina e deve estar envolvida com a estabilidade do citoesqueleto. Em girassol, a proteína HaPLIM-1 foi detectada em pequenas estruturas citoplasmáticas localizadas no micrósporo e na região cortical dos grãos de pólen, concentrando-se principalmente na actina do citoesqueleto.

De acordo com os resultados observados no direcionamento da proteína e na visualização da expressão dos transcritos do gene *Zmlim-1*, o envolvimento deste em interações com a actina do citoesqueleto é suportado pela forte localização citoplasmática de ZMLIM-1 em células

meristemáticas do ápice de raízes, uma região caracterizada pela alta presença de F-actina e miosina, responsáveis pela organização do citoesqueleto.

Para avaliar o papel do gene *Zmlim-1* foram produzidas plantas transgênicas de milho visando a superexpressão do gene. No entanto, os nossos resultados mostram que houve supressão do gene *Zmlim-1* na maioria dos eventos. Isso provavelmente foi devido ao alto número de cópias integradas no genoma. A análise dessas plantas em ensaios de hidroponia na presença de Al não permitiu a identificação de diferenças com relação ao controle não transgênico, não sendo possível uma conclusão sobre o papel do gene *Zmlim-1* na tolerância ao Al.

4.3 Caracterização das proteínas que interagem com ZMLIM-1

O domínio LIM é caracterizado por apresentar diversas funções biológicas dentre as quais se destacam a regulação da expressão gênica, citoarquitetura, adesão e mobilidade celular, transdução de sinais. As proteínas de domínio LIM são consideradas mediadoras da interação proteína-proteína.

Até o momento, não existem relatos na literatura envolvendo a descoberta de possíveis interatores para as proteínas contendo o domínio LIM em plantas. Sabe-se que as duas proteínas de girassol, PLIM-1 e WLIM-1 são estruturalmente relacionadas às proteínas musculares de animais CRP1, CRP2 e CRP3/MLP e poderiam apresentar funções semelhantes em plantas. As três proteínas animais são componentes essenciais da organização da actina do citoesqueleto, particularmente em sítios de adesão de membrana (adesão focal) e têm sido caracterizados por apresentarem interações com proteínas do citoesqueleto, α -actina e zyxina (Sadler et al., 1992).

A fim de elucidar a função desta proteína em milho, o ensaio de duplo híbrido foi empregado. Através deste ensaio, foi possível identificar três proteínas que interagem com a

proteína ZMLIM-1: duas proteínas da subunidade ribossomal (*RPL31* e *RPS21*) e uma proteína da família OMT envolvida na biossíntese de lignina (ZRP4-OMT).

As proteínas ribossomais L31 e S21 são componentes da subunidade maior (60S) e menor (40S) do complexo dinâmico da regulação da tradução. As duas proteínas localizam-se no citoplasma. Em milho no mínimo dois membros da família gênica de proteínas ribossomais S21, A e B, são diferencialmente regulados, sendo que S21A é altamente expresso em ovos e zigotos, mas apresenta baixa expressão em tecidos somáticos enquanto S21B é expresso em todos os tecidos exceto em ovos e zigotos. A proteína ribossomal L31 é caracterizada principalmente devido a sua proximidade com a saída do túnel peptídico em leveduras. A interação com essas duas proteínas ribossomais indica que a proteína ZMLIM-1 poderia estar envolvida com a tradução em células de milho, abrindo uma interessante perspectiva de estudos futuros.

Além disso, a proteína ZMLIM-1 interagiu com ZRP4-OMT. Este é o primeiro relato para um parceiro potencial de proteínas LIM em plantas. OMT é uma enzima importante da via biossintética da lignina. A lignina é um dos principais componentes da parede celular e plantas, constituindo cerca de 20-30% do peso seco de tecidos do vaso. Entre suas funções promove diversas vantagens adaptativas às plantas, através do suporte mecânico e sustentação às plantas, auxilia no transporte de solutos no sistema vascular, impede a perda excessiva de água pela transpiração, bem como auxilia na proteção da planta contra o ataque de patógenos. É composta por álcoois denominados monolignóis ou fenilpropanóides sintetizados na via metabólica dos fenilpropanóides. Existem poucos trabalhos associados às proteínas interatoras de OMT. Zhang et al., (1997) verificaram que OMT1 interage com a proteína AFT1 em leveduras.

Plantas transgênicas de tabaco e eucalipto expressando o gene *Ntlm-1* antisense, apresentaram redução no nível dos transcritos de alguns genes principais envolvidos na via dos fenilpropanóides, como a fenilalanina amônia-liase (PAL), a 4-hydroxycinnamato CoA ligase (4CL) e apresentaram redução de lignina 28% (Kawaoka et al., 2000; 2006). O nível de outros

transcritos: caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase (CCoAOMT), caffeic acid O-methyltransferase (COMT), cinnamyl redutase CoA (CCR) e cinnamyl álcool desidrogenase (CAD) não foi afetado em plantas de eucalipto que apresentaram redução no conteúdo de lignina.

Ao verificarmos a interação da proteína ZMLIM-1 com a proteína ZRP4-OMT, decidimos verificar se as plantas transgênicas silenciadas para o gene *Zmlim-1* poderiam estar envolvidas com a biossíntese de lignina. Através do ensaio colorimétrico por fluoroglucinol e da avaliação do conteúdo de lignina em 4 plantas transgênicas da geração T1, foi possível observar que 3 plantas apresentaram uma redução significativa no conteúdo de lignina (30-40%, Tabela 2). Considerando que o gene *Zmlim-1* foi inserido na orientação sense a fim de ser superexpresso, esperava-se um aumento no nível dos transcritos.. Para nossa surpresa, como mencionado anteriormente, somente uma das plantas avaliadas apresentou níveis mais elevados do transcrito *Zmlim-1* comparativamente ao controle não transgênico (HiII x B73). Outras três plantas tiveram uma redução significativa na expressão do gene *Zmlim-1*. A redução no conteúdo de lignina nas plantas silenciadas estão em concordância com os dados apresentados por Kawaoka et al., (2000, 2006), que verificaram redução de 20 – 28% no conteúdo de lignina de plantas nocauteadas para o gene *Ntlim-1*. Esses autores observaram que o silenciamento do gene *Ntlim-1* causa redução na expressão de genes envolvidos com a síntese de lignina, o que explicaria a redução deste componente nas plantas. Adicionalmente, as alterações anatômicas observadas nas raízes de plantas de milho silenciadas para o gene *Zmlim-1*, associadas aos dados de expressão gênica em praticamente todos tipos celulares da raiz, sugerem que a proteína ZMLIM-1 pode desempenhar uma variedade de funções nas células de milho.

5 CONCLUSÕES

- O gene *Zmlim-1* foi expresso abundantemente nas raízes, ápice e brotos, mas não apresentou expressão em folhas adultas.
- A hibridização *in situ* demonstrou que o transcrito de *Zmlim-1* acumula-se na maioria dos tipos celulares da zona meristemática da raiz, onde os três meristemas primários são encontrados, sendo que na coifa observou-se baixa expressão, reforçando a idéia de que este gene poderia desempenhar um papel no funcionamento das várias partes da planta.
- A expressão transiente revelou que a proteína ZMLIM-1 está localizada no citoplasma e no núcleo.
- O perfil de expressão do gene *Zmlim-1* mostrou que este gene é ativado na linhagem tolerante em resposta ao Al. No entanto, os resultados com plantas transgênicas não foi conclusivo, uma vez que a maioria dos eventos avaliados apresentou silenciamento do gene endógeno.
- O ensaio de duplo híbrido permitiu a identificação de duas proteínas ribossomais que interagem com ZMLIM-1, sugerindo que essa poderia estar envolvida no processo de tradução.
- Os dados de interação da proteína ZMLIM-1 com a proteína ZRP4-OMT e o menor teor de lignina observado em plantas transgênicas silenciadas para o gene *Zmlim-1* forneceram evidências de que esse gene pode influenciar o metabolismo de lignina.
- As alterações anatômicas observadas nas raízes de plantas silenciadas para o gene *Zmlim-1* sugerem que a proteína ZMLIM-1 pode desempenhar uma variedade de funções nas células de milho.

6 REFERÊNCIAS

- AHAD, A. & NICK, P. Actin is bundled in activation-tagged tobacco mutants that tolerate aluminum. *Planta* 225: 251-467, 2007.
- AHN, S.J., SIVAGURU, M., CHUNG, G.C., RENGEL, Z., MATSUMOTO, H. Aluminum-induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx of H⁺ across the plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*) *Journal Exp Bot* 53:1959-66, 2001.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L. SCHAFFER, A.A., ZHANG, J.H., AHANG, Z., MILLER, W. LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res* 25:3389-3402, 1997.
- AMENÓS, M., CORRALES, I., POSCHENRIEDER, C., ILLÉS, P., BALUŠKA, F., BARCELÓ, J. Different effects of aluminium on the actin cytoskeleton and brefeldin A-sensitive vesicle recycling in root apex cells of two maize varieties differing in root elongation rate and Al tolerance. *Plant Cell Physiol*: 50:528-40. 2009.
- ANOOP, V.M., BASU, U., MCCAMMON, M.T., MCALISTER-HENN, L., TAYLOR, G.J. Modulation of citrate metabolism alters aluminum tolerance in yeast and transgenic canola overexpressing a mitochondrial citrate synthase. *Plant Physiol* 132:2205-2217, 2003.
- BALUSKA, F., BRAILSFORD, R.W., HAUSKRECHT, M., JACKSON, M.B., BARLOW, P.W. Cellular dimorphism in the maize root cortex: involvement of microtubules, ethylene and gibberellin in the differentiation of cellular behavior in postmitotic growth zones. *Bot Acta* 106: 394-403, 1993a.
- BALUSKA F, BARLOW PW, VOLKMANN D Complete disintegration of the microtubular cytoskeleton precedes its auxin-mediated reconstruction in postmitotic maize root cells. *Plant Cell Physiol* 37: 1013-1021, 1996.
- BALTZ, R.; DOMON, C., PILLARY, D.T.N., STEINMETZ, A. Characterization of a pollen-specific cDNA from sunflower encoding a zinc finger protein. *Plant Journal* 2: 713-721, 1992a.
- BALTZ, R., EVRARD, J. L., DOMON, C., STEINMETZ, A. A LIM motif is present in a pollen-specific protein. *Plant Cell* 4:1465-1466, 1992b.
- BALTZ, R., EVRARD, J.L., BOURDON, V., STEINMETZ, A: The pollen-specific LIM protein PLIM-1 from sunflower binds nucleic acids in vitro. *Sexual Plant Reproduction* 9: 264-268, 1996.
- BALTZ, R., SCHMIT, A.C., KOHNEN, M., HENTGES, F. AND STEINMETZ, A. Differential localization of the LIM domain protein PLIM-1 in microspores and mature pollen grains from sunflower. *Sexual Plant Reproduction* 12, 60-65, 1999.
- BARCELÓ J, POSCHENRIEDER C Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and Experimental Botany* 48: 75-92, 2002.
- BASKIN TI, WILSON JE, CORK A, WILLIAMSON RE Morphology and microtubule organization in *Arabidopsis* roots exposed to oryzalin or taxol. *Plant Cell Physiol* 35: 935-942, 1994.
- BASKIN TI, WILSON JE Inhibitors of protein kinases and phosphatases alter root morphology and disorganize cortical microtubules. *Plant Physiol* 113: 493-502, 1997.
- BASU U, GOOD A, TAYLOR GJ Transgenic *Brassica napus* plants overexpressing aluminum-induced mitochondrial manganese superoxide dismutase cDNA are resistant to aluminum. *Plant Cell Environ* 24: 1269-1278, 2001.
- BLANCAFLOR EB, HASENSTEIN KH Organization of cortical microtubules in graviresponding maize roots. *Planta* 191: 231-237, 1993.
- BLANCAFLOR EB, HASENSTEIN KH Effect of osmotic stress on growth and microtubule orientation of *Zea mays* roots. *Int J Plant Sci* 156: 774-783, 1995a.
- BLANCAFLOR EB, HASENSTEIN KH Time course and auxin sensitivity of cortical microtubule reorientation in maize roots. *Protoplasma* 185: 72-82, 1995b.
- BLANCAFLOR, E., JONES, D., AND GILROY, S. Alterations in the cytoskeleton accompany aluminum-induced growth inhibition and morphological changes in primary roots of maize. *Plant Physiology* 118: 159-172, 1998.

- BENNET RJ, BREEN CM, FEY MV Aluminum induced changes in the morphology of the quiescent center, proximal meristem and growth region of the root of *Zea mays*. *S Afr J Bot* 51: 355-362, 1985
- Brière, C., Bordel, A.C., Barthou, H., Jauneau, A., Steinmetz, A., Alibert, G., and Petitprez, M. Is the LIM-domain protein HaWLIM1 associated with cortical microtubules in sunflower protoplasts? *Plant Cell Physiol.* 44: 1055-1063, 2003.
- BOSCOLO, R.S., MENOSSE, M., JORGE, R.A. Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*, 62:181-189, 2003.
- CANÇADO, G.M.A., LOGUERCIO, L.L., MARTINS: R., PARENTONI, S.N., PAIVA, E., BOREM, A., LOPES, M.A. Hematoxylin staining as a phenotypic index for aluminum tolerance selection in tropical maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 99:747-754, 1999.
- CAKMAK, I., HORST, W.J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*) *Physiol Plant* 83:463-468, 1991.
- CAUSIER, B. & DAVIS, B. Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Molecular Biology* 50, 855-870, 2002.
- CHRISTENSEN, A.H., AND QUAIL, P.H. Ubiquitin promoter-based vectors for high level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res.* 5: 213-218, 1996.
- CORRALES, I., POSCHENRIEDER, C., BARCELÓ, J. Boron induced amelioration of aluminum toxicity in a monocot and a dicot species. *J Plant Physiology* 165: 504-513, 2008.
- DEAN, J.F.D. In W.V. Dashek, (ed.) *Methods in plant biochemistry and molecular biology*. CRC Press, New York. Lignin analysis. p 199-215, 1997.
- DELHAIZE E., CRAIG S., BEATON C.D., BENNET R.J., JAGADISH V.C., RANDALL P.J. Aluminum Tolerance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) I. Uptake and Distribution of Aluminium in Root Apices. *Plant Physiology*, 103:685-93, 1993.
- DELHAIZE, E., RYAN, P.R. Aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol* 107: 315-321, 1995.
- DELHAIZE, E., HEBB, D.M., RICHARDS, K.D., LIN, J.M., RYAN, P.R., GARDNER, R.C. Cloning and expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphatidylserine synthase cDNA - Overexpression in plants alters the composition of phospholipids. *J Biol Chem* 274:7082-7088, 1999.
- DELHAIZE, E., HEBB, D.M., RYAN, P.R. Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol* 125:2059-2067, 2001.
- DELHAIZE, E.; RYAN, P.R.; HOCKING, P.J.; RICHARDSON, A.E. Effects of altered citrate synthase and isocitrate dehydrogenase expression on internal citrate concentrations and citrate influx from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) roots. *Plant and Soil* 248,137-144, 2003
- DELHAIZE, E., HEBB, D.M., RYAN, P.R., YAMAMOTO, Y., SASAKI, T., MATSUMOTO, H. Engineering high level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15249-54, 2004.
- DREW, J.E., GATEHOUSE, J.A. Isolation and characterization of a pea pod cDNA encoding a putative blue copper protein correlated with lignin deposition. *J Exp Bot* 45: 1873-1884, 1994.
- DOYLE, J. J. E DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. *Phytochem. Bull. Bot. Soc. Amer.* 19: 11-15, 1987.
- ELIASSON, A., GASS, N., MUNDEL, C., BALTZ, R., KRÄUTER, R., EVRARD, J.L., AND STEINMETZ, A. Molecular and expression analysis of a LIM protein gene family from flowering plants. *Mol. Gen. Genet.* 264, 257-267, 2000.
- ERMOLAYEV, V., WESCHKE, W., MANTEUFFEL, R. Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars. *J. Exp. Bot.* 54: 2745-2756, 2003.
- EZAKI, B, GARDNER, R.C, EZAKI, Y, KONDO, H, MATSUMOTO, H: Protective roles of two aluminum (Al)-induced genes, HSP150 and SED1 of *Saccharomyces cerevisiae*, in Al and oxidative stresses. *Fems Microbiology Letters* 159: 99-105, 1998.
- EZAKI, B, SIVAGURU, M, EZAKI, Y, MATSUMOTO, H, GARDNER, R.C: Acquisition of aluminum tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by expression of the BCB or NtGDI1 gene derived from plants. *Fems Microbiology Letters* 171: 81-87, 1999.

- EZAKI, B., GARDNER, R. C., EZAKI, Y. & MATSUMOTO, H. Expression of Aluminum-Induced Genes in Transgenic Arabidopsis Plants Can Ameliorate Aluminum Stress and/or Oxidative Stress Plant Physiol. 122, 657-665, 2000.
- EZAKI, B., KATSUHARA, M., KAWAMURA, M., MATSUMOTO, H. Different Mechanisms of Four Aluminum (Al)-Resistant Transgenes for Al Toxicity in Arabidopsis Plant Physiol 127: 918-927, 2001.
- FREYD, G., KIM, S.K., HORVITZ, H.R. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-II*, Nature 344: 876-879, 1990.
- FUENTE J.M. DE LA, RAMÍREZ-RODRÍGUEZ V., CABRERA-PONCE J.L., HERRERA-ESTRELLA L. Aluminum Tolerance in Transgenic Plants by Alteration of Citrate Synthesis. Science Magazine, 276:1566-68, 1997.
- GENTILE, A.; DITT, R.F.; DIAS, F.O.; DA SILVA, M.J.; DORNELAS, M.C.; MENOSSI, M. Characterization of ScMat1, a putative TFIIF subunit from sugarcane. Plant Cell Reports 28: 663-672, 2009.
- GRABSKI S, ARNOYS E, BUSCH B, SCHINDLER M Regulation of actin tension in plant cells by kinases and phosphatases. Plant Physiol 116: 279-290, 1998.
- GUNSÉ, B., POSCHENRIEDER, C., BARCELÓ, J. Water transport properties of roots and root cortical cells in próton and Al-stressed maize varieties. Plant Physiol 113:595-602, 1997.
- GUNSÉ, B., POSCHENRIEDER, C., BARCELÓ, J. The role of ethylene metabolism in the short term responses to aluminum by roots of two maize cultivars different in Al-resistance. Environ Exp Bot 43:73-81, 2002.
- HARPER, J. W., ADAMI, G.R., WEI, N. KEYOMARSI, K., ELLEDGE, S.J. The Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 75, 805-816, 1993.
- HEIM, A., LUSTER, J., BRUNNER, I., FREY, B. FORSSARD, E. Effects of aluminum treatment on Norway spruce roots: aluminum binding forms, element distribution, and release of organic substances. Plant Soil 216: 103-115, 1999
- HORST, W.J.; SCHMOHL, N.; KOLLMEIER, M.; BALUSKA, F.; SIVAGURU, M. Does aluminum affect root growth of maize through interaction with the cell wall - plasma membrane - cytoskeleton continuum? Plant Soil 215: 163-174, 1999.
- ILLES, P., SCHLICHT, M., PAVLOVKIN, J. LICHTSCHEIDL, I., BALUSKA, F., OVECKA, M. Aluminum toxicity in plants: internalization of aluminum into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membrane potential, endosomal behavior, and nitric acid production. J Exp Bot 57: 4201-4213, 2006.
- INAMOTO, S.; SEGIL, N.; PAM, Z-Q.; KIMURA, M. & ROEDER, R. G. The cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) assembly factor, MAT1, targets and enhances CAK activity on the POU domains of octamers transcription factors. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 272, N° 47, 29852-29858, 1997.
- ISHIKAWA, H., Evans, M.L. Specialized Zones of Development in Roots. Plant Physiol, Plant Physiol. 109:725-727, 1995
- JAMES, P. , HALLADAY, J. & CRAIG, E. A. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. Genetics 144: 1425-1436, 1996.
- JANSEN S, BROADLEY M, ROBBRECHT E, SMETS E. Aluminum hyperaccumulation in angiosperms: a review of its phylogenetic significance. *Botanical Review* 68: 235-269, 2002a.
- JONES, D.L., GILROY, S., LARSEN, P.B., HOWELL, S.H., KOCHIAN, L.V. Effect of aluminum on Ca^{2+} homeostasis in root hairs of *Arabidopsis thaliana* (L.) Planta 206:378-387, 1998.
- JORGE, R.A, ARRUDA, P: Aluminum-induced organic acids exudation by roots of an aluminum-tolerant tropical maize. Phytochemistry 45: 675-& ,1997.
- JORGE, R.A., MENOSSI, M., ARRUDA, P. Probing the role of calmodulin in Al toxicity in maize. Phytochemistry 58, 415-422, 2001.
- JORGE, R.A.; MENOSSI, M. Effect of anion channel antagonists and La^{3+} on citrate release, Al content and Al resistance in maize roots. Journal of Inorganic Biochemistry 99, 2039-2045, 2005. KADRMAS, J.L., SMITH, M.A., CLARK, K.A., PRONOVOST, S.M. The integrin effector PINCH regulates JNK activity and epithelial migration in concert with Ras suppressor 1. Journal Cell Biol 167(6):1019-24, 2004.

- KARIMI, M., INZE, D. AND DEPICKER, A. GATEWAY vectors for Agrobacterium mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7 (5), 193-195, 2002.
- KAWAOKA, A., KAO THIE N, P., YOSHIDA, K., ENDO, S., YAMADA, K., AND EBINUMA, H. Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis. *Plant J.* 22, 289-301, 2000.
- KAWAOKA, A., NANTO, K., ISHII, K., EBINUMA, H. Reduction of Lignin Content by Suppression of Expression of the LIM Domain Transcription Factor in *Eucalyptus camaldulensis*. *Silvae Genetica* 55(6):269-277, 2006
- KARLSSON, O., THOR, S., NORBERG, T., OHLSSON, H., EDLUND, T. Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain, *Nature* 344: 879-882, 1990.
- KEMPER, E.L., CORD-NETO, G., PAPES, F., MARTINE Z., MORAES, K.C., LEITE, A., ARRUDA, P. The role of opaque-2 on the control of lysine degrading activities in developing maize endosperm. *Plant Cell* 11:1981-1994, 1999.
- KIDD, P. S.; LLUGANY, M.; POSCHENRIEDER, C.; GUNSE, B.; BARCELO, J. The role of root exudates in aluminum resistance and silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 52 (359): 1339-1352, 2001.
- KINRAIDE, T.B. Ion fluxes considered in terms of membrane-surface electrical potentials. *Aust J Plant Physiol* 28: 605-616, 2001
- KOCHIAN L.V. Cellular Mechanisms of Aluminum Toxicity and Resistance in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46: 237-260, 1995.
- KOCHIAN, L.V., HOECKENGA, O.A., PIÑEROS, M.A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanism of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Ann Rev Plant Biol* 55:459-493, 2004.
- KOLLMEIER, M., FELLE, H.H., HORST, W.J. Genotypical differences in Al resistance of *Zea mays* (L.) are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by Al? *Plant Physiol* 122: 945-56, 2000.
- KOYAMA, H., KAWAMURA, A., KIHARA, T., HARA, T., TAKITA, E., SHIBATA, D. Overexpression of mitochondrial citrate synthase in *Arabidopsis thaliana* improved growth on a phosphorus-limited soil. *Plant Cell Physiol.* 41:1030-1037, 2000.
- KUMAR, P.B.A.M; DUSHENKOV, V.; MOTTO, H. Phytoextraction: The use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental Science Technology*, 29: 1232-1238, 1995.
- LAZOF, D.B., GOLDSMITH, J.G., RUFTY, T.W., LINTON, R.W. Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips - A microanalytical study using secondary-ion mass-spectrometry. *Plant Physiol* 106:1107 - 1114, 1994
- LIANG, P., PARDEE, A.B. Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction, *Science* 257:967-971, 1992.
- LOGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry*, v.163, p.16-20, 1987
- MA, J.F., ZHENG, S.J., MATSUMOTO, H. Specific secretion of citric acid induced by Al stress in *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol* 38: 1019-1025, 1997.
- MA, J.F., ZHENG, S.J., NAGAO, S., TANIMOTO, E. Aluminum targets elongating cells by reducing cell wall extensibility in wheat roots. *Plant Cell Physiol* 45: 583-589, 2004.
- MA, J.F. Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants *Int Rev Cytol* 264: 225-252, 2007
- MACHADO, E. C; PEREIRA, A. R. Eficiência de conversão e coeficiente de manutenção da planta inteira, das raízes e da parte aérea em milho e arroz submetidos ao estresse de alumínio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 25: 845-855, 1990.
- MAGALHAES JV, LIU J, GUIMARÃES CT, LANA UG, ALVES VM, WANG YH, SCHAFFERT RE, HOECKENGA OA, PIÑEROS MA, SHAFF JE, KLEIN PE, CARNEIRO NP, COELHO CM, TRICK HN, KOCHIAN LV. A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nat Genet.* 39:1156-61, 2007.

- MAGNAVACA, R., C.O. GARDNER & R.B. CLARK, Evaluation of inbred maize lines for aluminum in nutrient solution. In: H.W. Gabelman & B.C. Loughman (Eds.), *Genetics Aspects of Plant Mineral Nutrition*, pp. 255-265, 1987
- MARIANO, E.D. ; KELTJENS, W.G. Long-Term Effects of Aluminum Exposure on Nutrient Uptake by Maize Genotypes Differing in Aluminum Resistance. *Journal of Plant Nutrition*, Estados Unidos, v. 28, n. 2, p. 323-333, 2005
- MILLER, W.J., McDonald, J.F., Nouaud, D., Anxolabehere, D. Molecular domestication - more than a sporadic episode in evolution. *Genetica* 107:197-207, 1999.
- MOON, H.D., OTTOBONI, L.M.M., SOUZA, A.P., et al. Somaclonal variation-induced aluminium-sensitive mutant from an aluminium-tolerant maize inbred line. *Plant Cell Reports*, Berlin, v.16, p.686-691, 1997
- MUNDEL, C.; BALTZ, R.; ELIASSON, A.; BRONNER, R.; GASS, N.; KRAUTER, R.; EVRARD, J.L.; STEINMETZ, A. A Lim domain protein from sunflower localizes to the cytoplasm and/or nucleus in a wide variety of tissues and associates with the phragmoplast in dividing cells. *Plant Molecular Biology* 42: 291-302, 2000.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497, 1962.
- NIAN, H; YANG, Z.; HUANG, H.; YAN, X.; MATSUMOTO, H. Citrate secretion induced by aluminum stress may not be a key mechanism responsible for differential aluminum tolerance of some soybean genotypes. *Journal of plant nutrition*, 27, (11), 2047-2066, 2004.
- NISHIYA, N.; SABE, H.; NOSE, K.; SHIBANUMA, M. The LIM domains of hic-5 protein recognize specific DNA fragments in a zinc-dependent manner in vitro. *Nucleic Acids research*, 26: 4267-4273, 1998.
- ONO, K., YAMAMOTO, Y., HACHIYA, A., MATSUMOTO, H. Synergistic inhibition of growth by aluminum and iron of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells in suspension culture. *Plant Cell Physiol.* 36, 115-125, 1995.
- PARKER, D.R., NORVELL, W.A., CHANEY, R.L. GEOCHEM-PC: a chemical speciation program for IBM and compatible computers. In: LOEPPERT, R.H., SCHWAB, A.P., GOLDBERG, S. eds, *Chemical Equilibrium and Reaction Models*. Soil Science Society of America, Madison, WI, pp 253-269, 1995.
- PAWSON, T., NASH, P. Assembly of Cell Regulatory Systems Through Protein Interaction Domains. *Science* 300:445-452, 2003.
- PELLET, D.M., GRUNES, D.L., KOCHIAN, L.V. Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Planta* 196:788-795, 1995.
- PELLET, D.M., PAPEMIK, L.A., KOCHIAN, L.V. Multiple aluminum-resistance mechanisms in wheat-roles of root apical phosphate and malate exudation. *Plant Physiology*, 112:591-597, 1996.
- PIÑEROS, M.A., KOCHIAN, L.V. A patch-clamp study on the physiology of aluminum toxicity and aluminum tolerance in maize identification and characterization of Al³⁺-induced anion channels. *Plant Physiol.* 125: 292-305, 2001.
- PINEROS, M.A., SHAFF, J.E., MANSLANK, H.S., ALVES, V.M., KOCHIAN, L.V. Aluminum resistance in maize cannot be solely explained by root organic acid exudation. A comparative physiological study. *Plant Physiol.* 137: 231-241, 2005.
- POMIÈS, P.; LOUIS, H.A; BECKERLE, M.C. CRP1, a LIM domain protein implicated in muscle differentiation, interacts with alpha-actinin. *Journal of Cell Biology* 139: 157-168, 1997.
- POSCHENRIEDER, C., GUNSÉ, B., CORRALES, I., BARCELÓ, J. A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Science of the total Env* 400: 356-368, 2008.
- RAMOS DIAZ, A., BRITO-ARGAEZ, L., MUNNIK, T., HERNANDEZ-SOTOMAYOR, S.M.T. Aluminum inhibits phosphatidic acid formation by blocking the phospholipase C pathway. *Planta* 225: 393-401, 2007.
- RAO, I.M., ZEIGLER, R.S., VERA, R., et al. Selection and breeding for acid-soil tolerance in crop. *BioScience*, Washington, v.43, n.7, p.454-465, 1993.
- RENGEL, Z. Role of calcium in aluminium toxicity. *The New Phytologist*, Cambridge, v.121, p.499-513, 1992.
- RENGEL, Z., ZHANG, W.H. Role of dynamics of intracellular calcium in aluminum-toxicity syndrome. *New Phytol* 159: 295-314, 2003.

- RICHARDS KD, SCHOTT EJ, SHARMA YK, DAVIS KR, GARDNER RC Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 116: 409-418, 1998.
- RYAN, P.R., DITOMASSO, J.M., KOCHIAN, L.V. Aluminum toxicity in roots: an investigation of spatial sensitivity and the role of the root cap *J Exp Bot* 44:437-446, 1993.
- SADLER, L.; CRAWFORD, A.W.; MICHELSEN, J.W.; BECKERLE, M.C. Zyxin and cCRP: two interactive LIM domain proteins associated with the cytoskeleton. *Journal of Cell Biology* 119: 1573-1587, 1992.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. In: *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Transfer of DNA from agarose gels to solid supports. 2:9.34-9.35, 1989.
- SASAKI, M.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H. Lignin deposition induced by aluminium in wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Physiologia Plantarum*, Copenhagen, v. 96, n. 2, p. 193-198, 1996.
- SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; EZAKI, B.; KATSUHARA, M.; AHN, S.J.; RYAN, P.R.; DELHAIZE, E.; MATSUMOTO, H. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant Journal*. 37, 645-653, 2004.
- SCOTT A, Wyatt S, Tsou P-L, Robertson D, Allen NS. Model system for plant cell biology: GFP imaging in living onion epidermal cells. *Biotechniques* 26, 1125-1132, 1999.
- SHARP, R.E., SILK, W.K., HSIAO, T.C. Growth Of The Maize Primary Root At Low Water Potentials .1. Spatial-Distribution Of Expansive Growth. *Plant Physiol* 87:50-57, 1988.
- SHERMAN F, FINK G, HINKS J. *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory; 1986.
- SIBOV, S.T., GASPAR, M., SILVA, M.J., OTTOBONI, L.M.M., ARRUDA, P., SOUZA, A.P. Two genes control aluminum tolerance in maize: Genetic and molecular mapping analyses. *Genome* 42:475-482, 1999.
- SIVAGURU, M., HORST, W.J. The transition zone is the most aluminium-sensitive apical root zone of *Zea mays* L. *Plant Physiol*. 116, 155-163, 1998.
- SIVAGURU, M.; YAMAMOTO, Y; MATSUMOTO, H. Differential impacts of aluminium on microtubule organization depends on growth phase in suspension-cultured tobacco cells. *Physiol.Plantarum* 107: 110-119, 1999.
- SIVAGURU, M., EZAKI, B., HE, Z.H., TONG, H., OSAWA, H., BALUSKA, F., VOLKMANN, D., MATSUMOTO, H. Aluminum-induced gene expression and protein localization of a cell wall-associated receptor kinase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 132:2256-66, 2003.
- SILVA, I.R.; SMYTH, T.J.; ISRAEL, D.W.; RAPER, C.D.; RUFTY, T.W. Magnesium ameliorates aluminum rhizotoxicity in soybean by increasing citric acid production and exudation by roots. *Plant Cell Physiol* 42, 546-554, 2001.
- TAIRA, M., OTANI, H., SAINT-JEANNET, J.PL, DAWID, I.B. Role of the LIM class homeodomain protein Xlim-1 in neural and muscle induction by the Spemann organizer in *Xenopus*. *Nature* 372: 677-679, 1994.
- TAYLOR, G.J. The physiology of aluminum phytotoxicity. In *Metal Ions in Biological System. Aluminum and Its Role in Biology*, Vol. 24. Edited by Sigel, H. and Sigel, A. pp. 123-163. Marcel Dekker, New York, EUA, 1988.
- TAYLOR GJ Current views on the aluminum stress response: the physiological basis of tolerance. *Curr Top Plant Biochem Physiol* 10: 57-93, 1991.
- TAYLOR G J Overcoming barriers to understanding the cellular basis of aluminium. *Plant Soil* 171, 89-103, 1995.
- TESFAYE, M., TEMPLE, S.J., ALLAN, D.L., VANCE, C.P., SAMAC, D.A. Overexpression of malate dehydrogenase in transgenic alfalfa enhances organic acid synthesis and confers tolerance to aluminum. *Plant Physiol* 127:1836-1844, 2001.
- TRANBARGER, T. J., Al-Ghazi, Y., Muller, B., Teyssendier, de la, Serve, B., Doumas, P., Touraine, B. Transcription factor genes with expression correlated to nitrate-related root plasticity of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*. 26:459-469, 2003.
- THOMAS, C., HOFFMANN, C., DIETERLE, M., VAN TROYS, M., AMPE, C., STEINMETZ, A. Tobacco WLIM1 is a novel F-Actin binding protein involved in actin cytoskeleton remodeling. *Plant Cell* 18:2194-2206, 2006.
- TÖPFER, R., MATZEIT, V., GRONENBORN, B., SCHELL, J. AND STEINBISS, H-H A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res*, 15, 5890, 1987

- VAN GYSEL, A., MONTAGU, M.V., INZE, D. A negatively light-regulated gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a protein showing high similarity to blue copper-binding proteins. *Gene* 136: 79-85, 1993.
- VAN SOEST, P.J. & WINE, R.H. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. *J. Assoc. Official Agr. Chem.*, 51:780-85, 1968.
- WADMAN, I.A; OSADA, H.; GRUTZ, G.G.; AGULNICK, A D.; WESTPHAL, H.; FORSTER, A; RABBITS, T.H. The LIM only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO Journal*, 16: 3145-3157, 1997.
- WAGATSUMA, T., ISHIKAWA, S., OBATA, H. Plasma membrane of younger and outer cells is the primary specific site for aluminum toxicity in root. *Plant and soil*, 171:105-112, 1995.
- WANG, Y.; XU, F. & HALL, F. H. The MAT1 cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) assembly/targeting factor interacts physically with the MCM7 DNA licensing factor. *FEBS Letters* 484, 17-21, 2000.
- WAY J.C., CHALFIE M. *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell*. 54: 5-16, 1988.
- WEISKIRCHEN, R; PINO, J D; MACALMA, T; BISTER, K; BECHERLE, MC The Cysteine-rich Protein Family of Highly Related LIM Domain Proteins *J Biol Chem*, 270,(48), 28946-28954, 1995.
- WENZL, P., PATIÑO, G.M., CHAVES, A.L., MAYER, J.E. AND RAO, I.M. The high level of aluminum resistance in signalgrass is not associated with known mechanisms of external detoxification in root apices. *Plant Physiol.* 125: 1473-1484, 2001.
- YAMAMOTO, Y., HACHIYA, A., MATSUMOTO, H. Oxidative damage to membrane by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 38, 1333-1339, 1997.
- YAMAMOTO, Y., KOBAYASHI, Y., MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol.* 125:199-208, 2001.
- YANG S.S, LIN, J.Y., LIN, Y.T. Microbiologically induced corrosion of aluminum alloys in fuel-oil/aqueous system. *J Microbiol Immunol Infect* 31(3): 151-164, 2001
- ZHANG, H., WANG, J., GOODMAN, H. M. An *Arabidopsis* gene encoding a putative 14-3-3 interacting protein, caffeic acid/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1353, 199-202, 1997.
- ZHENG SJ, MA JF, MATSUMOTO H High aluminum resistance in buckwheat. Al-induced special secretion of oxalic acid from root tips. *Plant Physiol* 117: 745-751, 1998a

7 ANEXO

Molecular characterization of ScTFIIAc, encoding the putative TFIIA small subunit from sugarcane

Agustina Gentile · Pedro Da Cruz ·
Rafael G. Tavares · Maria Graziela Krug-Baldacin ·
Marcelo Menossi

Received: 25 March 2010 / Revised: 27 April 2010 / Accepted: 5 May 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Transcription mediated by RNA polymerase II depends on a set of different transcription factors to form the pre-initiation complex. TFIIA is involved in the construction of this complex and increases the affinity of TBP for the DNA union region in vitro. In this study, we characterized the ScTFIIAc gene, which encodes a homolog of the smaller subunit (c) of transcription factor TFIIA in sugarcane. RNA blot analysis showed that ScTFIIAc transcripts accumulate in all tissues evaluated, with higher levels in leaf roll and flowers. In situ hybridization showed that ScTFIIAc was expressed in different cells of the reproductive meristem. In sugarcane plantlets, methyl jasmonate and abscisic acid treatments as well as phosphate starvation had no influence on ScTFIIAc transcript accumulation. The subcellular localization assay demonstrates that ScTFIIAc protein is directed to the cell nucleus. The phylogenetic analysis, the expression in several tissues and under different treatments and the nuclear localization are in line with the putative role of ScTFIIAc as a subunit of basal transcription factor.

Keywords ScTFIIAc ! Sugarcane ! Transcription factor ! In situ hybridization ! GFP

Communicated by P. Puigdomenech.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00299-010-0871-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Gentile ! P. Da Cruz ! R. G. Tavares !
M. G. Krug-Baldacin ! M. Menossi (✉)
Laboratório de Genoma Funcional, Departamento de Genética,
Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas, 13083-875 Campinas,
São Paulo 6109, Brazil
e-mail: menossi@lgf.ib.unicamp.br

Introduction

Transcription in eukaryotic genes requires the assembly of the enzyme RNA polymerase II and the general transcription factor IID (TFIID) on the promoter to form the pre-initiation complex (PIC) (Pan et al. 2000). TFIIA is one of the basal transcription factors that influence critical steps for transcription initiation and the PIC assembly, by increasing the affinity of TATA binding protein (TBP) for DNA (Lee et al. 1992; Robinson et al. 2005). The complex TFIID/DNA is stabilized by TFIIA by interaction with the N-terminal region of TBP and the DNA (Tan et al. 1996; Kokubo et al. 1998; Kim et al. 2008). Mutational studies show the importance of the TFIIA-TBP interaction for transcription (Kang et al. 1995; Ozer et al. 1998). TFIIA is required for TFIID-directed activated transcription in vitro and the response to several classes of transcription activators that requires interaction between TBP and TFIIA in vivo (Sun et al. 1994; Tan and Richmond 1998). By crystal structure analyses, it was seen that TFIIA binds as a heterodimer to the side of the TBP/TATA complex, opposite to the place that binds TFIIB (Geiger et al. 1996; Tan et al. 1996; Bleichenbacher et al. 2003).

The yeast TFIIA is a heterodimeric protein complex, formed by TOA1 and TOA2 (Ranish and Hahn 1991). These proteins can be divided in two parts: an N-terminal helical region and a beta-strand containing the C-terminal region (Callebaut et al. 2005). The smaller subunit (TOA2) presents high identity compared with the homologs in humans and *Drosophila melanogaster* (Bleichenbacher et al. 2003). In vitro transcription performed with extracts from yeast strains with mutations in either subunits of TFIIA demonstrated that this protein complex stimulates the transcription by the RNA polymerase II (Kang et al. 1995). The TFIIA-depleted extracts have normal Pol I and

Pol III transcription activity, showing that TFIIA is a specific Pol II transcription factor (Kang et al. 1995).

The human homolog of TFIIA is composed by three polypeptides: a/b (large subunit, 42KDa) and c (small subunit, with 12KDa) (Ozer et al. 1994; Bleichenbacher et al. 2003). Both large and small subunits are required for TFIIA function (Ozer et al. 1994; Sun et al. 1994; Zawel et al. 1995). In humans, although the mRNAs encoded by the general transcription factors are expressed in all tissues, some of them present higher expression levels in some tissues such as the testis (Upadhyaya et al. 1999).

Although TFIIA is a well-studied general transcription

factor in humans and yeast, very few plant general transcription factors have been cloned (Gash et al. 1990; Baldwin et al. 1996). In *Arabidopsis*, Li et al. (1999) analyzed the TFIIA large and small subunits revealing that the TFIIA large subunit contains a transcription activation domain, which may be unique to plants. The small *Arabidopsis* TFIIA subunit seems to be highly conserved between humans, *Drosophila* and yeast, while the large subunit is conserved only at the N- and C-terminal regions of the protein (Li et al. 1999).

According to the data from the SUGEST (Sugarcane EST Project), there are three sugarcane assembled sequences (SAS) that encode protein homologs to the human TFIIA: SCCCLR1048A04.g, SCCCLR4007B08.g and SCMCLR1122D05.g. As an initial step to characterize a sugarcane homolog of TFIIA, we studied the gene corresponding to the SCMCLR1122D05.g SAS. This gene was named ScTFIIA and its expression in different tissues and in response to stress and hormones was evaluated by northern blot. The localization of ScTFIIA transcripts was determined using in situ hybridization. To evaluate its subcellular localization, ScTFIIA was fused to the green fluorescent protein (GFP) and assayed in onion epidermis cells.

Materials and methods

Plant material and treatments

Sugarcane plants from the variety SP80-3280 were grown in the field at the Cane Technology Center (Piracicaba, Brazil). To evaluate the expression patterns under phosphate deficiency, sugarcane plantlets were grown in the absence of phosphate for different periods of time (from 0 to 48 h). For treatment with hormones, sugarcane plantlets were grown in vitro for 4 months and then abscisic acid (ABA) was added to the medium at a final concentration of 100 μ M. Leaves were harvested at 0, 6 and 12 h after treatment. The same final concentration of methyl jasmonate (MeJA) was added to the medium, but leaves were harvested at 0, 1 and 12 h. These conditions were the same

as those used previously to assess gene expression changes in sugarcane (Schlöggl et al. 2008).

Cloning and PCR analyses

The sugarcane fragment that encodes the homolog of the smaller subunit of the transcription factor TFIIA was amplified by PCR using the SAS SCMCLR1122D05.g as template. The complete coding sequence of the gene (318 bp) was amplified using a different pair of primers (accession number GU120202). These primers contained sites for different restriction enzymes needed to be cloned into the expression vectors. The forward primer sequence (5'-GAA TCC ATG GCC ACC TTC GAG CTG-3') had the EcoRI site, and the reverse primer sequence (5'-CTC GAG CTA TTG TCC GAG CAA TTT GG-3') had the XhoI site. The PCR product was then sub-cloned into pGEMT-easy (Promega, USA) and transformed into *E. coli* cells. The confirmation of transformants was made by PCR analyses and enzyme digestion.

RNA extraction and northern blot analyses

The RNA was isolated from different sugarcane tissues using Trizol (Life Technologies, USA). The RNA was resolved on agarose with formaldehyde and quantified in spectrophotometer (Gene Quant, Amersham Biosciences,

Brazil). Probes were obtained using 5–50 ng of total RNA and the Ready to go labeling bead (-dCTP) kit (Amersham Biosciences, Brazil). The hybridization and washing steps were done according to Sambrook et al. 1989. The images obtained by the Image Gauge program (Fujifilm, Japan) were analyzed to quantify the signal from each spot.

The probe was purified using Sephadex G50 columns (AP-Biotech, Brazil). The hybridization solution (50% v/v formamide, 59 SSC, 20 mM sodium phosphate of pH 6.8, 1% SDS, 5% p/v of dextran sulfate) was prepared and warmed to 42°C. The probe was denatured at 100°C for 5 min and transferred to ice. After 2 min on ice, it was centrifuged and added to the hybridization solution. The incubation was done at 42°C for 18 h.

After incubation, the membranes were washed twice with a solution containing 0.29 SSC and 0.1% SDS, the first at room temperature and the second at 65°C, for 20 min each. After washing, the membranes were sealed and exposed in cassettes from Phosphor image FLA3000 (Fujifilm, Japan). After a 24 h exposure, the probe was removed from the membrane by washing them with SDS 0.1% at 42°C for 20 min, twice.

In situ hybridization

Digoxigenin labeling of RNA probes, tissue preparation and hybridization conditions were performed as described

before (Gentile et al. 2009). The template for the TFIIAc digoxigenin-labeled riboprobes was the 318 pb fragment, containing the complete coding region, cloned in pGEMT-easy vector. The hybridized sections from sugarcane inflorescences were viewed after an overnight staining and photographed under a Zeiss Axiovert 35 microscope (Zeiss, Germany).

Subcellular localization

Construction of the 35S::ScTFIIAc::GFP chimeric gene

The ScTFIIAc full-length cDNA (SAS SCMCLR 1122D05.g) was used as template for a PCR using primer pair 5⁰-GAA TTC ATG GCC ACC TTC GAG C-3⁰ (forward) and 5⁰-GGA TCC TTG TCC GAG CAA TTT GG-3⁰ (reverse). The resulting PCR product was subcloned into the plasmid pGEMT-easy (Promega, USA) and digested with EcoRI and BamHI, so that the 3⁰-end of the ScTFIIAc coding sequence was fused to the 5⁰-end of GFP in frame, and the whole ScTFIIAc-GFP chimeric gene was under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter in the pRT104 vector. A 35S::GFP construct was used as control for localization studies.

Transient expression assays

The pRT104::ScTFIIAc::GFP plasmid was introduced into onion cells by particle bombardment. Fresh onion bulbs were cut into slices of 1 cm² and placed on the central area of a Petri dish. Tungsten particles of 1.1 mm in diameter were prepared and coated with plasmid DNA according to the manufacturer's recommendations (BioRad, USA). Bombardments were performed using the Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System with the following parameters: helium pressure, 1,200 psi; chamber vacuum, 27 inches Hg (*0.06 atm); particle bombardment was done as previously described (Gentile et al. 2009). Each sample was bombarded two times and then incubated in a growth chamber at 25°C for 20–24 h. A single layer of onion epidermal cells was peeled and examined for ScTFIIAc-GFP expression under a fluorescence microscope.

Detection of GFP signals

Transient expression of ScTFIIAc-GFP fusion protein in onion epidermal cells was detected with the Leica DMI 4000 B fluorescence microscope (Leica, Germany). The single epidermal layer of the transformed onion was examined under 109 magnification. Green fluorescence signals were obtained by blue light illumination and a

bandpass filter for GFP. GFP fluorescence images were acquired using a Leica DFC 300 FX digital camera (Leica, Germany).

Results

Cloning and sequence analysis

The coding sequence of ScTFIIAc was amplified by PCR using SAS SCMCLR1122D05.g as template and then sequenced. Figure 1 shows the alignment of the ScTFIIAc protein sequence with the homologs from humans (Fig. 1a), rice (*Oryza sativa*) and *Arabidopsis thaliana* (Fig. 1b). The sequence homology between sugarcane and humans was only 48.2%, while within plants the homology was much higher. With the close-related rice, the identity was around 95%, while with *Arabidopsis* it was 82.1%. Another alignment was done using sequences from different plants and also from organisms from different kingdoms (Fig. 1c). This alignment was used to build a neighbor-joining tree (Fig. 2). The TFIIAc from sugarcane were grouped into the same clade (monocotyledonous clade) with rice, sorghum and maize, showing that all sequences shared high similarity. The other sequences from plants were grouped into the same clade (the dicotyledonous clade) and were separated from humans, yeast and *Drosophila*, corroborating the low identity observed between the sequences during the alignment (Fig. 1).

ScTFIIAy expression analyses

The expression of ScTFIIAc in different sugarcane tissues was evaluated by northern blot (Fig. 3). ScTFIIAc transcripts were detected in leaf, leaf roll (immature leaf), first and fourth internode, root, lateral bud and flower (Fig. 3a). Differences in the level of transcripts between these tissues were observed, and the highest expression was seen in leaf roll and flowers. The rice homolog of ScTFIIAc (Sugio et al. 2007) is induced when rice plants are infected with bacteria. Because methyl jasmonate and abscisic acid are involved in plant responses to bacterial attack (Yuan et al. 2007, Gudesblat et al. 2009), we decided to evaluate ScTFIIAc expression in response to these hormones. However, ScTFIIAc expression was not affected by exposure to methyl jasmonate or abscisic acid in leaves of young plantlets (Fig. 3b). We also tested the effect of an abiotic stress, phosphate deficiency in roots, but no change in ScTFIIAc expression was observed compared to control plants (Fig. 3c). Data on gene expression intensities are provided in the supplementary material (Table S1).

(A)	
1_sugarcane	MATFELYRRSTIGMCLTETLDEMVNNGTSLPELAIQVLIQFDKSMdaleNQVKSvNIK
2_humans	MA-YQLYRNTTLGNSLQESLDELIOQQITPQLALQVLLQFDKAINAALQVRVNRVNR
	::*::** * *::***::: :*:***:***:***::: **::*::***::
1_sugarcane	GHLHTYRFDNVWTFILTEASFKEETTEQVGKVKIVACDSKLLGQ----
2_humans	GSLNIYRFDNVWTFVLNDVEFREVTELIKVDKVKIVACDGNKTSNTTE
	* *::*****::*::*::: :*::*****::* *
(B)	
Sugarcane	MATFELYRRSTIGMCLTETLDEMVNNGTSLPELAIQVLIQFDKSMdaleN
Arabidopsis	MATFELYRRSTIGMCLTETLDEMVSQSGTSLPELAIQVLIQFDKSMTEALES
Rice	MATFELYRRSTIGMCLTDTLDDMVSSGALSPELAIQVLIQFDKSMTEALES
	*****::***:*.::*::*****::*****::**
Sugarcane	QVKSvNIKGHLHTYRFDNVWTFILTEASFKEETTEQVGKVKIVACDSK
Arabidopsis	QVKTQVSIKGHLHTYRFDNVWTFILQDAMFKSDDRQENVSRVKIVACDSK
Rice	QVKSvTVKGHLHTYRFDNVWTFILTDALFKNEETITINKVKIVACDSK
	:*.::**::*****::: * *::: *::*****::
Sugarcane	LLGQ---
Arabidopsis	LLTQ---
Rice	LLTKEE
	**
(C)	
Humans	-MA---YQLYRNTTLGNSLQESLDELIOQQITPQLALQVLLQFDKAINAALQVRVNRV
Drosophila	-MS---YQLYRNTTLGNTLQESLDELIOYGGITPGLAFKVLQFDKINNANLQVRKARV
Sugarcane	MAT---FELYRRSTIGMCLTETLDEMVNNGTSLPELAIQVLIQFDKSMdaleNQVKSv
Zea	MAT---FELYRRSTIGMCLTETLDEMVSNGTSLPELAIQVLIQFDKSMdaleNQVKSv
Rice	MAT---FELYRRSTIGMCLTDTLDDMVSSGALSPELAIQVLIQFDKSMTEALESQVKSv
Sorghum	MAT---FELYRRSTIGTCLTETLDELVSAGVSPELAIQVLIQFDKSMTEALEMQVKSv
Ricinus	-----
Vitis	MAT---FELYRRSTIGMCLTETLDEMVSNGTSLPELAIQVLIQFDKSMTEALESQVKSv
Medicago	MAT---FELYRRSTIGMCLTETLDEMVSNGTSLPELAIQVLIQFDKSMTEALEMQVKSv
Populus	-----
Arabidopsis	MAT---FELYRRSTIGMCLTETLDEMVSQSGTSLPELAIQVLIQFDKSMTEALESQVKTQV
Yeast	MAVPGYYELYRRSTIGNSLVDALDTLISDGRIEASLAMRVLETQDKVVAETLKDNTQSKL
Humans	NFR-GSLNIYRFDNVWTFVLNDVEFREV-----ELIKVDKVKIVACDGN
Drosophila	TFKAGKLNIYRFDNVWTFVLNDVEFREVH-----EIVKVDKVKIVACDGN
Sugarcane	NIK-GHLHTYRFDNVWTFILTEASFKEE-----TTEQVGKVKIVACDSK
Zea	TVK-GHLHTYRFDNVWTFILTDASFKEE-----ATEQVGKVKIVACDSK
Rice	TVK-GHLHTYRFDNVWTFILTDALFKNEE-----ITETINKVKIVACDSK
Sorghum	NVK-GHLHTYRFDNVWTFILTDALFKNEE-----IQETLGKVKIVACDSK
Ricinus	---GHLHTYRFDNVWTFILQDALFKNE-----SQENVGRVKIVACDSK
Vitis	TIK-GHLHTYRFDNVWTFILQDALFKNEE-----SQENVGRVKIVACDSK
Medicago	SIK-GHLHTYRFDNVWTFILQDALFKNE-----NQENVGRVKIVACDSK
Populus	---GHLHTYRFDNVWTFILQDAMFKNE-----TQENVGRVKIVACDSK
Arabidopsis	SIK-GHLHTYRFDNVWTFILQDAMFKSDD-----RQENVSRVKIVACDSK
Yeast	TVK-GNLDTYGECDDWTFIVKNCQVTVEDSHRDASQNGSGDSQSVISVDKLRIVACNSK
	^ ^,AA AAA:AAA::: : , ::::AAAA: ^
Humans	NTGSNTTE
Drosophila	-SGEF---
Sugarcane	LLGQ---
Zea	LLGQ---
Rice	LLTKEE-
Sorghum	LLQPQQP-
Ricinus	LLTQ---
Vitis	LLTQ---
Medicago	LLSQ---
Populus	LLTQ---
Arabidopsis	LLTQ---
Yeast	KSE----

b Fig. 1 Alignment of ScTFIIAc sequence (SAS SCMLR1122D05.g) with protein homologs. a Alignment with the human homolog. b Alignment with homologs of rice and Arabidopsis thaliana. c Alignment with homologous sequences from monocot and dicot plants, and homologs from different kingdoms. Sequence accession numbers: sugarcane (GU120202), maize (NP_001152705), rice (NP_001045526), sorghum (XP_002457019), human (NP_004483), Drosophila (NP_524467), yeast (NP_012865), Arabidopsis (NP_194175), Populus trichocarpa (EEE93519.1), Ricinus communis (XP_002527359), Vitis vinifera (XP_002285630.1) and Medicago trunculata (ACJ84075.1). In all cases, the ClustalW2 program was used. Asterisks indicate that the residues in that column are identical, colon indicates conserved substitutions, dot indicates semi-conserved substitutions

In situ hybridization

To investigate the ScTFIIAc expression patterns at a cellular level, we hybridized a TFIIA probe to longitudinal sections of sugarcane reproductive meristem at different developmental stages (Fig. 4). The expression of ScTFIIAc was observed in glumes, palea, lodicules, floral meristem and spikelet pair meristem (Fig. 4a, b, c). Figure 4d shows the hybridization with the ScTFIIAc sense probe (negative control).

Subcellular localization

To study the subcellular localization of ScTFIIAc, a chimeric gene containing a ScTFIIAc::GFP fusion was

constructed (Fig. 5a). In a transient expression assay, the 35S::ScTFIIAc-GFP chimeric gene was introduced into onion epidermal cells by particle bombardments and then examined using a fluorescence microscope. GFP signals were detected in the nuclei of onion cells (Fig. 5b), whereas the control (35S::GFP) displayed diffused patterns of localization (Fig. 5c). The results of transient expression of ScTFIIAc-GFP fusion protein indicated that ScTFIIAc was directed to the cell nuclei of the onion epidermal cells.

Discussion

In this study, we characterized the ScTFIIAc gene from sugarcane. We found a high identity sequence between the members of the plant kingdom (95% with rice and 82.1% with Arabidopsis), in contrast to a low identity found with the human homolog (48.2%). This is consistent with previous results obtained in Arabidopsis, where the amino acid sequence analysis revealed 49% degree of conservation between the small subunit of Arabidopsis with Drosophila and human small subunits, and only 41% with yeast, which presents an internal extension of 14 amino acids that is absent in higher eukaryotes (Li et al. 1999). In line with those results from sequence alignment, more protein sequences were aligned and a neighbor-joining (NJ) tree was made. It can be seen that all the monocotyledonous plants were grouped inside the same clade, sharing a high sequence similarity, while sequences of the other plants were grouped into another clade (dicotyledonous clade). Sequences from humans, yeast and Drosophila showed a bigger phylogenetic distance, showing that there were low identities between them and plants. We can speculate that the divergences found between plant TFIIAc and the homologs from other organisms might reflect different roles of this protein in plants.

ScTFIIAc transcripts were ubiquitously detected in all tissues evaluated, but differences in the level of transcripts were observed and the highest expression was seen in leaf roll (immature leaf) and flowers. These results reinforce the role of TFIIA as a basal transcription factor, which is more expressed in young and active plant tissue, as in leaf roll and young inflorescence, where the cell division rate is high. A gene encoding another putative subunit of a basal transcription factor in sugarcane, ScMAT1, had the same expression pattern when analyzed in the same plant tissues, showing the highest expression in immature leaf and flowers (Gentile et al. 2009). Also, mRNA corresponding to both subunit genes of Arabidopsis TFIIA was detected in all tissues analyzed, such as flowers, leaves and roots among others (Li et al. 1999). ScTFIIAc expression presented no changes in leaves treated with methyl jasmonate (MeJA) or abscisic acid (ABA) and in roots exposed to low

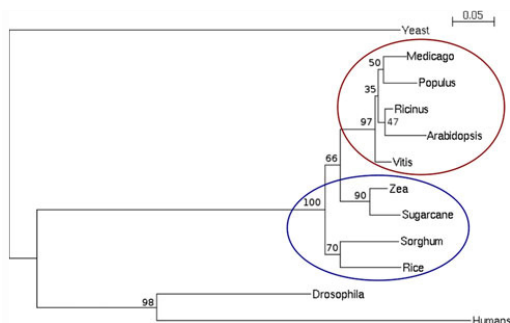


Fig. 2 Neighbor-joining tree of TFIIAc protein sequences from sugarcane and other species. TFIIAc sequences were aligned to construct a distance tree with the neighbor-joining algorithm. The blue circle indicates the sequences from monocots; the red circle indicates sequences from dicots. Bootstrap values are in percentage above each node. The sequence alignment and the neighbor-joining tree were done using the CLUSTALW2 program. Sequences accession numbers: sugarcane (GU120202), maize (NP_001152705), rice (NP_001045526), sorghum (XP_002457019), human (NP_004483), Drosophila (NP_524467), yeast (NP_012865), Arabidopsis (NP_194175), Populus trichocarpa (EEE93519.1), Ricinus communis (XP_002527359), Vitis vinifera (XP_002285630.1) and Medicago trunculata (ACJ84075.1)

Fig. 3 ScTFIIAc gene expression in sugarcane. **a** Expression in different tissues. 1 leaf, 2 leaf roll, 3 internode 1, 4 internode 4, 5 lateral bud, 6 root and 7 flower. **b** Expression in response to methyl jasmonate (MeJA) and abscisic acid (ABA) after different times (in hours) indicated above each well. **c** Expression in roots with phosphate (?P) and without phosphate (-P) in time (hours)

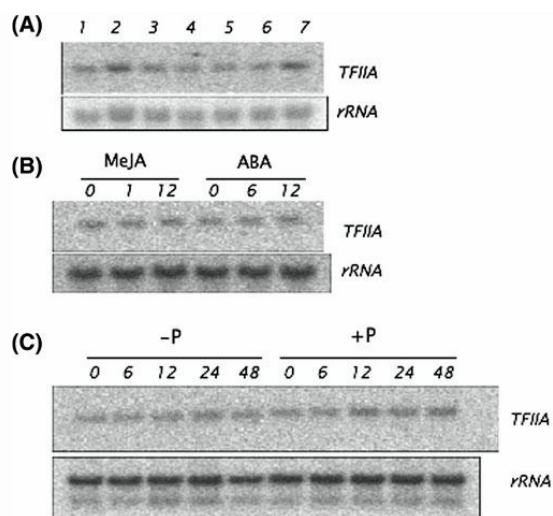
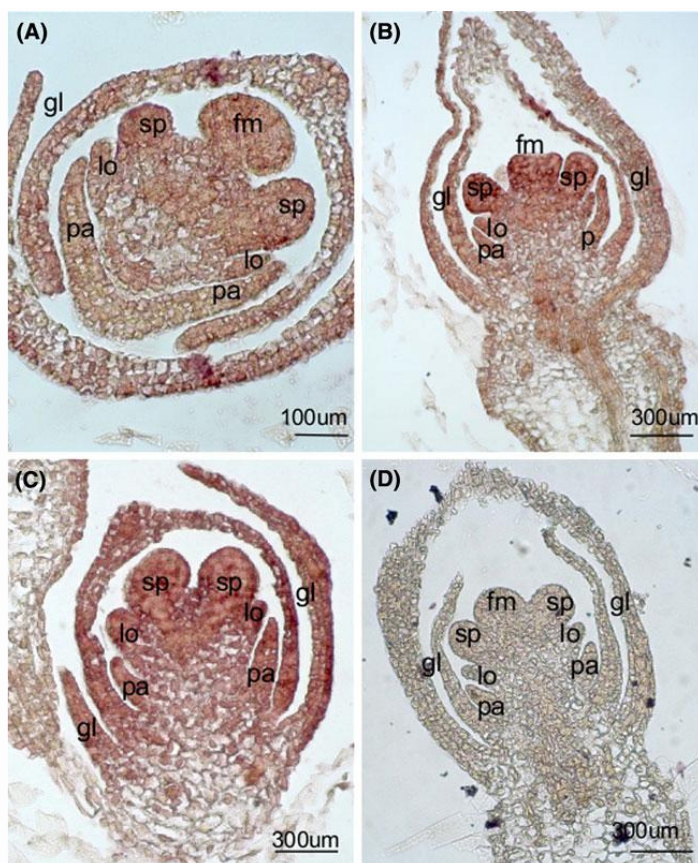


Fig. 4 In situ localization of ScTFIIAc transcripts in sugarcane reproductive meristem. All sections are longitudinal. **a**, **b** and **c** are with the antisense probe, and **d** is with the sense one. The hybridization signal with the ScTFIIAc probe can be observed as a purple precipitate. **gl** glumes, **pa** palea, **lo** lodicules, **sp** spikelet pair meristem, **fm** floral meristem



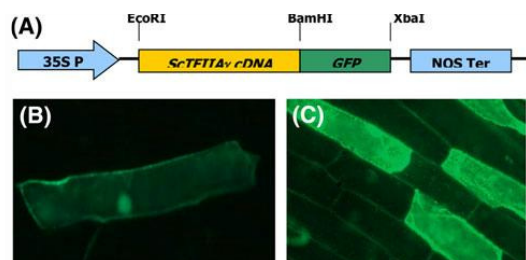


Fig. 5 Subcellular localization of ScTFIIAc. a The chimeric gene that was expressed transiently in onion cells. b After the particle bombardments with the chimeric gene, GFP signals were detected in the nuclei of onion cells. c The control (35S::GFP) displayed diffuse patterns of localization inside the cytoplasm

levels of phosphate. This expression profile is in agreement with the data from the Arabidopsis and rice homologs available in public microarray databases. The TFIIAc homolog in Arabidopsis (At4g24440, corresponding to the protein NP_194175 used in Fig. 2) is expressed in most tissues, such as stem, leaf, seeds and inflorescence, while no changes were observed in response to hormone applications such as ABA, MeJA, IAA, GA-3 and ACC, among others (The Bio-Array Resource for Plant Functional Genomics, <http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>, Winter et al. 2007). We also searched another public gene expression database (<http://www.plexdb.org>, Wise et al. 2007) to evaluate the expression of the rice TFIIAc homolog, NP_001045526. The rice gene is expressed in most tissues, such as embryo, endosperm, leaf, root, mature flower and seedlings (experiments ID Os5 and Os8). Moreover, the expression of the rice homolog was not affected by hormone treatment (experiment Os28), phosphate deficiency (experiment Os31) and stresses such as drought, salt and cold as well (experiment Os10). These data are in agreement with our findings, further supporting the role of the sugarcane gene as a basal transcriptional factor.

To investigate the cell types where ScTFIIAc is active, an in situ hybridization assay was done. The ubiquitous expression of ScTFIIAc in the floral meristem agrees with the putative role of TFIIA proteins as basal transcription factor, corroborating with the results found in the northern blot analysis.

The results of transient expression of ScTFIIAc-GFP fusion protein indicated that the ScTFIIAc protein was translocated to the cell nuclei of the onion epidermal cells, indicating that TFIIAc functions in nuclei, in agreement with the putative function as a transcription factor. Other TAFs in *Flaveria trinervia*, an orthologous gene for TATA box-binding protein-associated factor 10 (FtTAF10) have been seen also to be translocated to the nuclei using GFP

fusion (Furumoto et al. 2005). The same was observed with a putative TFIIH subunit (ScMAT1) from sugarcane, which was directed to the nucleus, as expected with a protein involved in transcription (Gentile et al. 2009).

In summary, in this study, we have characterized ScTFIIAc, which encodes a sugarcane gene presenting high similarity to basal transcription factors. Further work with plants overexpressing or silencing ScTFIIAc will help to improve our knowledge on TFIIA proteins in transcription in plants.

Acknowledgments This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grants 01/07546-1 and 05/58104-0 to MM. We are very grateful to Eduardo

Kiyota for technical assistance and Raphael S. Mattos for his help with the phylogenetic analysis. PLC, RGT and MGKB received fellowships from FAPESP.

References

- Baldwin DA, Gurley WB (1996) Isolation and characterization of cDNAs encoding transcription factor IIB from Arabidopsis and soybean. *Plant J* 10:561–568
- Bleichenbacher M, Tan S, Richmond TJ (2003) Novel interactions between the components of human and yeast TFIIA/TBP/DNA complexes. *J Mol Biol* 332:783–793
- Callebaut I, Prat K, Meurice E, Mornon JP, Tomavo S (2005) Prediction of the general transcription factors associated with RNA polymerase II in *Plasmodium falciparum*: conserved features and differences relative to other eukaryotes. *BMC Genomics* 6:1–20
- Furumoto T, Tamada Y, Izumida A, Nakatani H, Hata S, Izui K (2005) Abundant expression in vascular tissue of plant TAF10, an orthologous gene for TATA Box-binding protein-associated Factor 10, in *Flaveria trinervia* and abnormal morphology of Arabidopsis thaliana transformants on its overexpression. *Plant Cell Physiol* 46(1):108–117
- Gasch A, Hoffmann S, Horikoshi M, Roeder RG, Chua NH (1990) Arabidopsis thaliana contains two genes for TFIIID. *Nature* 346:390–394
- Geiger JH, Hahn S, Lee S, Sigler PB (1996) Crystal structure of the yeast TFIIA/TBP/DNA complex. *Science* 272:830–836
- Gentile A, Ditt RF, Dias FO, Da Silva MJ, Dornelas MC, Menossi M (2009) Characterization of ScMAT1, a putative TFIIH subunit from sugarcane. *Plant Cell Rep* 28(4):663–672
- Gudesblat GE, Torres PS, Vojnov AA (2009) Xanthomonas campestris overcomes Arabidopsis innate immunity through a DSF cell-to-cell signal-regulated virulence factor. *Plant Physiol* 149:1017–1027
- Kang JJ, Auble DT, Ranish JA, Hahn S (1995) Analysis of the yeast transcription factor TFIIA: distinct functional regions and a polymerase II-specific role in basal and activated transcription. *Mol Cell Biol* 15(3):1234–1243
- Kim Y, Ebright YW, Goodman AR, Reinberg D, Ebright RH (2008) Non-radioactive, ultrasensitive site-specific protein-protein photocrosslinking: interactions of α -helix 2 of TATA-binding protein with general transcription factor TFIIA and transcriptional repressor NC2. *Nucleic Acid Res* 36(19):6143–6154
- Kokubo T, Swanson MJ, Nishikawa JL, Hinnebusch AG, Nakatani Y (1998) The yeast TAF145 inhibitory domain and TFIIA

- competitively bind to TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 18:1003–1012
- Lee DK, Dejong J, Hashimoto S, Horikoshi M, Roeder RG (1992) TFIIA induces conformational changes in TFIID via interactions with the basic repeat. *Mol Cell Biol* 12:5189–5196
- Li YF, Gouirrec JL, Torki M, Kim YJ, Guerinéau F, Zhou DX (1999) Characterization and functional analysis of Arabidopsis TFIIA reveal that the evolutionary unconserved region of the large subunit has a transcription activation domain. *Plant Mol Biol* 39(3):515–525
- Ozer J, Moore P, Bolden A, Lee A, Rosen C, Lieberman P (1994) Molecular cloning of the small (gamma) subunit of human TFIIA reveals functions critical for activated transcription. *Genes Dev* 8:2324–2335
- Ozer J, Lezina LE, Ewing J, Audi S, Lieberman P (1998) Association of transcription factor IIA with TATA binding protein is required for transcriptional activation of a subset of promoters and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 18:2559–2570
- Pan S, Czarniecka-Verner E, Gurley WV (2000) Role of the TATA binding protein-transcription factor IIB interaction in supporting basal and activated transcription in plant cells. *Plant Cell* 12:125–135
- Ranish JA, Hahn S (1991) The yeast general transcription factor TFIIA is composed of two polypeptide subunits. *J Biol Chem* 266(29):19320–19327
- Robinson MM, Yatherajam G, Ranallo RT, Bric A, Paule MR, Stargell LA (2005) Mapping and functional characterization of the TAF11 interaction with TFIIA. *Mol Cell Biol* 25(3):945–957
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Press, NY
- Schlögl PS, Nogueira FT, Drummond R, Felix JM, De Rosa V Jr, Vicentini R, Leite A, Ulian E, Menossi M (2008) Identification of new ABA- and MEJA-activated sugarcane bZIP by data mining in the SUCEST database. *Plant Cell Rep* 27(2):335–345
- Sugio A, Yang B, Zhu T, White FF (2007) Two type III effector genes of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* control the induction of the host genes *OsTFIIA* and *OsTFX1* during bacterial blight of rice. *PNAS* 104(25):10720–10725
- Sun X, Ma D, Sheldon M, Yeung K, Reinberg D (1994) Reconstitution of human TFIIA activity from recombinant polypeptides: a role in TFIID-mediated transcription. *Genes Dev* 8:2336–2348
- Tan S, Richmond TJ (1998) Eukaryotic transcription factors. *Curr Opin Struct Biol* 8:41–48
- Tan S, Hunziker Y, Sargent DF, Richmond TJ (1996) Crystal structure of a yeast TFIIA-TBP-DNA complex. *Nature* 381:127–134
- Upadhyaya AB, Lee SH, DeJong J (1999) Identification of a general transcription factor TFIIAa/b homolog selectively expressed in testis. *J Biol Chem* (25):18040–18048
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An „electronic fluorescent pictograph“ browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* 2(8):e718
- Wise RP, Caldo RA, Hong L, Shen L, Cannon EK, Dickerson JA (2007) In: Edwards D (ed) *Plant Bioinformatics—methods and protocols*. Methods in molecular biology 406:347–363. Humana Press, Totowa
- Yuan Y, Zhong S, Li Q, Zhu Z, Lou Y, Wang L, Wang J, Wang M, Li Q, Yang D, He Z (2007) Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that *OsNPR1/NH1* is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechnol J* 5:313–324
- Zawel L, Reinberg D (1995) Common themes in assembly and function of eukaryotic transcription factors. *Annu Rev Biochem* 64:533–561